



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

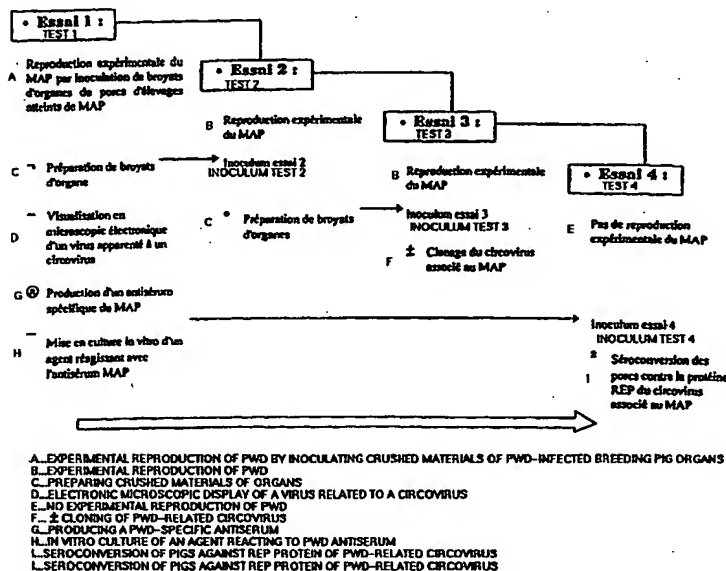
<p>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : C12N 15/34, 15/86, C07K 14/01, C12N 7/04, 5/10, 7/00, A01K 67/027, C12Q 1/68, C07K 16/08, G01N 33/569</p>	<p>A2</p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 99/29871</b> (43) Date de publication internationale: 17 juin 1999 (17.06.99)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/02634 (22) Date de dépôt international: 4 décembre 1998 (04.12.98) (30) Données relatives à la priorité: 97/15396 5 décembre 1997 (05.12.97) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL D'ETUDES VETERINAIRES ET ALIMENTAIRES [FR/FR]; 23, avenue du Général de Gaulle, F-94700 Maisons-Alfort (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): JESTIN, André [FR/FR]; 14, rue Jacques Cartier, F-22000 Saint-Brieuc (FR). ALBINA, Emmanuel [FR/FR]; 11, rue du Roussillon, F-22950 Trégueux (FR). LE CANN, Pierre [FR/FR]; La Noë de Craffault, F-22960 Plédran (FR). BLANCHARD, Philippe [FR/FR]; 26, rue du 8 Mai 1945, F-22190 Plérin (FR). HUTET, Evelyne [FR/FR]; 20, rue Vice Amiral Kersaint, Saint Laurent, F-22190 Plérin (FR). ARNAULD, Claire [FR/FR]; 34, boulevard Clémenceau, F-22000 Saint-Brieuc (FR). TRUONG, Catherine [FR/FR]; 24, rue de Rohan, F-22000 Saint-Brieuc (FR). MAHE, Dominique [FR/FR]; 3, rue des Fontaines, F-22150 Saint-Carreuc</p>	<p>(FR). CARIOLET, Roland [FR/FR]; 30, rue de l'Aubépine, F-22440 Ploufragan (FR). MADEC, François [FR/FR]; Rue du Valais, F-22000 Saint-Brieuc (FR). (74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR). (81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet aripi (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  Publiée Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</p>	

(54) Title: CIRCOVIRUS SEQUENCES RELATED TO PIGLET WEIGHT LOSS DISEASE (PWD)

(54) Titre: SEQUENCES DE CIRCOVIRUS ASSOCIE A LA MALADIE DE L'AMAIGRISSEMENT DU PORCELET (MAP)

## (57) Abstract

The invention concerns the genome sequence and the nucleotide sequences coding for the PWD circovirus polypeptides, such as said circovirus structural and non-structural polypeptides, and vectors including said sequences and cells or animals transformed by said vectors. The invention also concerns methods for detecting said nucleic acids or polypeptides and kits for diagnosing infection by a PWD circovirus. The invention further concerns a method for selecting compounds capable modulating the viral infection. Finally the invention concerns pharmaceutical, in particular vaccine, compositions for preventing and/or treating viral infections caused by PWD circovirus and the use of said vector for preventing and/or treating diseases by gene therapy.



(57) Abrégé

L'invention a pour objet la séquence génomique et des séquences nucléotidiques codant pour des polypeptides de circovirus MAP, tels que les polypeptides structuraux et non structuraux dudit circovirus, ainsi que des vecteurs incluant lesdites séquences et cellules ou animaux transformés par ces vecteurs. L'invention concerne également des procédés de détection de ces acides nucléiques ou polypeptides et des kits de diagnostic d'infection par un circovirus MAP. L'invention vise aussi une méthode de sélection de composés capables de moduler l'infection virale. L'invention comprend enfin des compositions pharmaceutiques, notamment vaccinales, pour la prévention et/ou le traitement d'infections virales par circovirus MAP ainsi que l'utilisation de vecteur selon l'invention pour la prévention et/ou le traitement de maladies par thérapie génique.

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brsil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

## SEQUENCES DE CIRCOVIRUS ASSOCIE A LA MALADIE DE L'AMAIGRISSEMENT DU PORCELET (MAP)

5

L'invention a pour objet la séquence génomique et des séquences nucléotidiques codant pour des polypeptides de circovirus MAP, tels que les polypeptides structuraux et non structuraux dudit circovirus, ainsi que des vecteurs incluant lesdites séquences et cellules ou animaux transformés par ces vecteurs. L'invention concerne également des  
10 procédés de détection de ces acides nucléiques ou polypeptides et des kits de diagnostic d'infection par le circovirus MAP. L'invention vise aussi une méthode de sélection de composés capables de moduler l'infection virale. L'invention comprend enfin des compositions pharmaceutiques, notamment vaccinales, pour la prévention et/ou le traitement d'infections virales par circovirus MAP ainsi que l'utilisation de vecteur  
15 selon l'invention pour la prévention et/ou le traitement de maladies par thérapie génique.

La maladie de l'amaigrissement du porcelet (MAP) ou encore appelé dépérissement fatal du porcelet (DFP) a été largement décrite en Amérique du Nord (Harding, J.C., 1997), et des auteurs ont rapporté l'existence d'une relation entre cette  
20 pathologie et la présence de circovirus porcin (Daft, B. et al., 1996 ; Clark, E.G., 1997 ; Harding, J.C., 1997 ; Harding, J.C. et Clark, E.G., 1997 ; Nayar, G.P. et al., 1997). Un circovirus porcin a déjà été mis en évidence dans des cultures cellulaires dérivées de porc établies en lignée et infectées chroniquement (Tischer, I., 1986, 1988, 1995 ; Dulac, G.C., 1989 ; Edwards, S., 1994 ; Allan, G.M., 1995 et McNeilly, F., 1996). Ce  
25 virus, lors d'infection expérimentale de porcelets, ne se révélait pas pathogène pour le porc (Tischer, I., 1986, Horner, G.W., 1991) et sa séquence nucléotidique a été déterminée et caractérisée (Tischer, I., 1982 ; Meehan, B.M. et al., 1997 ; Mankertz, A., 1997). Le circovirus porcin, dénommé virus PCV, fait partie du genre circovirus de la famille des circoviridae (Murphy, F.A. et al., 1995) dont le virion possède un ADN  
30 circulaire de taille compris entre 1,7 et 2,3 kb, ADN qui comprend 3 cadres ouverts de lecture (ORF1 à ORF3), codant pour une protéine de réplication REP impliquée dans la phase d'initiation et de terminaison de la réplication circulaire déroulante (RCR)

(Heyraud-Nitschke, F., et al., 1995 ; Harding, M.R. et al., 1993 ; Hanson, S.F. et al., 1995 ; Fontes, E.P.B. et al., 1994), codant pour une protéine de capsid (Boulton, L.H. et al., 1997 ; Hackland, A.F. et al., 1994 ; Chu, P.W.G. et al., 1993 et codant pour une protéine non structurale dite de dissémination (Lazarowitz, S.G. et al., 1989).

5 Les auteurs de la présente invention ont remarqué que les manifestations cliniques perceptibles chez le porc et liées à l'infection par le circovirus MAP, sont très individualisées. Ces manifestations apparaissent en général sur des porcs de 8 à 12 semaines d'âge, sevrés depuis 4 à 8 semaines. Les premiers signes sont l'hypotonie sans qu'on puisse parler de prostration. Rapidement (48 heures), les flancs se creusent, la  
10 ligne du dos se dessine, les porcs "blanchissent". Ces signes s'accompagnent en général d'hyperthermie, d'anorexie et le plus souvent de manifestations respiratoires (toux, dyspnée, polypnée). Des diarrhées transitoires peuvent également apparaître. La phase d'état de la maladie dure environ un mois au terme de laquelle les taux de mortalité varient de 5 à 20 %. A ces mortalités il convient d'ajouter une proportion variable (5-  
15 10 %) d'animaux cadavériques ne pouvant plus représenter un avenir économique. Il est à noter qu'en dehors de ce stade critique de fin de post-sevrage, aucune anomalie n'apparaît dans les élevages. En particulier, la fonction de reproduction est parfaitement maintenue.

Sur le plan épidémiologique, les premières manifestations de cette pathologie  
20 sont apparues au début de 1995 dans l'Est du département des Côtes d'Armor en France, et les élevages atteints sont surtout cantonnés dans cette zone du département. En décembre 1996, le nombre des élevages concernés ne peut être évalué avec précision en raison de l'absence de méthode de diagnostic spécifique au laboratoire ni de dispositif d'épidémiosurveillance du cheptel. En se basant sur les faits cliniques ainsi que sur des  
25 résultats d'examen nécropsiques fournis par les vétérinaires, on peut estimer ce nombre à plusieurs dizaines (80-100). La contagiosité de la maladie est faible à modérée. Des cas sont signalés en dehors de la zone initiale et font suite pour la plupart au transfert d'animaux venant d'élevages connaissant le problème. En revanche, une particularité de l'affection est sa forte rémanence. Ainsi, des élevages atteints depuis une année sont-ils  
30 toujours concernés en dépit de l'application massive de thérapeutiques. Les élevages à expression clinique se recrutent dans les différentes catégories de spécialisation (naisseurs-engraisseurs, post-sevrage-engraisseurs) et différentes structures



économiques sont concernées. Par ailleurs, les troubles apparaissent même dans des élevages où les règles de la zootechnie sont respectées.

De nombreux examens nécropsiques ont été réalisés soit dans les élevages soit au laboratoire. Les éléments du tableau lésionnel sont disparates. Les lésions macroscopiques les plus constantes sont de la pneumonie qui se présente parfois en damier ainsi qu'une hypertrophie des ganglions lymphatiques. Les autres lésions concernent surtout les viscères thoraciques dont notamment péricardite et pleurésie. Mais des arthrites, des ulcères gastriques sont également observés. Les lésions révélées à l'examen histologique se situent essentiellement au niveau pulmonaire (pneumonie interstitielle), ganglionnaire (déplétion lymphoïde des noeuds lymphatiques, cellules géantes) et rénal (glomérulonéphrite, vascularite). Les agents infectieux ont fait l'objet de recherches larges. L'intervention des pestivirus et de la maladie d'Aujeszky a pu être exclue. Les troubles apparaissent dans les troupeaux SDRP (Syndrome Dysgénésique et Respiratoire Porcin, infection liée à un artérovirus) séropositif, mais le rôle de ce dernier dans la genèse des troubles n'a pu être établi (la majorité des élevages de Bretagne sont SDRP séropositifs).

Les auteurs de la présente invention, dans le but d'identifier l'agent étiologique responsable de la MAP, ont réalisé des épreuves de "contact" entre porcelets manifestement "malades" et des porcs EOPS (Exempts d'Organismes Pathogènes Spécifiques) du CNEVA (Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires, France). Ces épreuves ont permis d'observer le développement dans les animaleries protégées des manifestations comparables à celles observées en élevage. Les manifestations discrètes telles que l'hyperthermie modérée, l'anorexie et la diarrhée intermittente, sont apparues après une semaine de contact. Il faut noter que le virus SDRP n'a diffusé que postérieurement aux manifestations cliniques. Par ailleurs, des inoculations de broyats d'organes d'animaux malades à des porcs sains a permis de reproduire des manifestations apparentées à celles observées dans les élevages, avec cependant une incidence moins forte liée aux conditions favorables d'entretien des animaux dans les installations expérimentales.

Ainsi, les auteurs de la présente invention ont pu mettre en évidence que les manifestations pathologiques se présentent comme une entité bien définie affectant le porc à un stade particulier de sa croissance.

Cette pathologie n'a jamais été décrite en France. Toutefois, des informations éparses notamment canadiennes relatent de faits apparentés.

Les troubles ne peuvent être maîtrisés par les thérapeutiques existantes.

Les données récoltées tant en élevage qu'en expérimentation ont permis de  
5 mettre en relief les points suivants :

- la maladie MAP est transmissible mais sa contagiosité est peu élevée,
- son origine étiologique est de nature infectieuse et probablement virale,
- la maladie MAP présente un caractère persistant dans les élevages atteints.

Il s'ensuit des conséquences économiques considérables pour les élevages.

10 Ainsi, un besoin important à ce jour concerne un diagnostic spécifique et sensible, de réalisation pratique et rapide, permettant le dépistage précoce de l'infection. Un test fiable, sensible et pratique, qui permette la distinction entre souches de circovirus porcin (PCV) est donc fortement désiré.

D'autre part, un besoin de traitement efficace, et bien toléré des infections à  
15 circovirus MAP reste également désiré, aucun vaccin aujourd'hui n'est disponible contre le circovirus MAP.

S'agissant du circovirus MAP, il faudra probablement comprendre le rôle de la défense immunitaire dans la physiologie et la pathologie de la maladie pour développer des vaccins satisfaisants.

20 Une information plus ample concernant la biologie de ces souches, leurs interactions avec leurs hôtes, les phénomènes d'infectivité associés et ceux d'échappement aux défenses immunitaires de l'hôte notamment, et leur implication enfin dans le développement des pathologies associées, permettra une meilleure compréhension de ces mécanismes. Compte tenu de ce qui précède et qui montre en  
25 particulier les limitations des moyens de lutter contre l'infection par le circovirus MAP, il est donc primordial aujourd'hui d'une part de développer des outils moléculaires, notamment à partir d'une meilleure connaissance génétique du circovirus MAP, mais également de mettre au point de nouveaux traitements préventifs et thérapeutiques, des nouvelles méthodes de diagnostic et de nouvelles stratégies vaccinales spécifiques,  
30 efficaces et tolérées. Ceci est précisément l'objet de la présente invention.

La présente invention a pour objet les séquences nucléotidiques du génome de circovirus MAP choisies parmi les séquences SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10 ou un de leurs fragments.

Les séquences nucléotidiques de séquences SEQ ID N° 1 et SEQ ID N° 2  
5 correspondent respectivement à la séquence génomique du brin de polarité (+) et du brin de polarité (-) du circovirus MAP de type A (ou PCVA), la séquence SEQ ID N° 2 étant représentée suivant l'orientation 5' → 3'.

Les séquences nucléotidiques de séquences SEQ ID N° 9 et SEQ ID N° 10  
10 correspondent respectivement à la séquence génomique du brin de polarité (+) et du brin de polarité (-) du circovirus MAP de type B (ou PCVB) la séquence SEQ ID N° 10 étant représentée suivant l'orientation 5' → 3'.

La présente invention a également pour objet des séquences nucléotidiques caractérisées en ce qu'elles sont choisies parmi :

- a) une séquence nucléotidique de fragment spécifique d'une séquence SEQ ID N° 1,  
15 SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10 ou un de leurs fragments ;
- b) une séquence nucléotidique homologue à une séquence nucléotidique telle que définie en a) ;
- c) une séquence nucléotidique complémentaire d'une séquence nucléotidique telle que définie en a) ou b), et une séquence nucléotidique de leur ARN correspondant ;
- 20 d) une séquence nucléotidique capable de s'hybrider dans des conditions stringentes avec une séquence telle que définie en a), b), ou c) ;
- e) une séquence nucléotidique comprenant une séquence telle que définie en a), b), c) ou d) ; et
- f) une séquence nucléotidique modifiée d'une séquence nucléotidique telle que  
25 définie en a), b), c), d) ou e).

On entendra par séquence nucléotidique, polynucléotide ou acide nucléique, selon la présente invention, aussi bien un ADN double brin ou simple brin dans des formes monomériques et dimériques (dites en tandem) que des produits de transcription desdits ADNs.

30 Il doit être compris que la présente invention ne concerne pas les séquences nucléotidiques génomiques prises dans leur environnement naturel, c'est-à-dire à l'état naturel. Il s'agit de séquences qui ont pu être isolées, purifiées ou partiellement

purifiées, à partir de méthodes de séparation telles que par exemple la chromatographie par échange d'ions, par exclusion basée sur la taille moléculaire, ou par affinité, ou encore les techniques de fractionnement basées sur la solubilité dans différents solvants, ou à partir de méthodes du génie génétique telles que l'amplification, le clonage et le sous-clonage, les séquences de l'invention pouvant être portées par des vecteurs.

Les séquences nucléotidiques SEQ ID N° 1 et SEQ ID N° 9 ont été obtenues par séquençage du génome par la méthode de Sanger.

Par fragment de séquence nucléotidique selon l'invention, on entendra désigner tout fragment nucléotidique du circovirus MAP, type A ou B, de longueur d'au moins 8 nucléotides, de préférence au moins 12 nucléotides, et encore plus préférentiellement au moins 20 nucléotides consécutifs de la séquence dont il est issu.

Par fragment spécifique de séquence nucléotidique selon l'invention, on entendra désigner tout fragment nucléotidique du circovirus MAP, type A ou B, présentant, après alignement et comparaison avec les fragments correspondants de circovirus porcins connus, au moins un nucléotide ou base de nature différente. Par exemple, les fragments nucléotidiques spécifiques du circovirus MAP de type A peuvent facilement être déterminés en se reportant à la figure 3 de la présente invention dans laquelle sont mis en évidence les nucléotides ou bases de la séquence SEQ ID N° 1 (circopordfp) qui sont de nature différente, après alignement de ladite séquence SEQ ID N° 1 avec les deux autres séquences de circovirus porcin connues (circopormech et circopormank).

Par séquence nucléotidique homologue au sens de la présente invention, on entend une séquence nucléotidique présentant au moins un pourcentage d'identité avec les bases d'une séquence nucléotidique selon l'invention d'au moins 80 %, de préférence 90 % et 95 %, ce pourcentage étant purement statistique et les différences entre les deux séquences nucléotidiques pouvant être réparties au hasard et sur toute leur longueur.

Par séquence nucléotidique homologue spécifique au sens de la présente invention, on entend une séquence nucléotidique homologue présentant au moins une séquence nucléotidique de fragment spécifique, telle que définie précédemment. Lesdites séquences homologues "spécifiques" peuvent comprendre, par exemple, les séquences correspondant à la séquence génomique ou aux séquences de ses fragments

représentatifs de variants de circovirus MAP de type A ou B. Ces séquences homologues spécifiques peuvent ainsi correspondre à des variations liées à des mutations au sein des souches de circovirus MAP de type A et B, et correspondre notamment à des troncatures, substitutions, délétions et/ou additions d'au moins un  
5 nucléotide. Lesdites séquences homologues peuvent également correspondre à des variations liées à la dégénérescence du code génétique.

Dans la présente description, on entendra désigner par circovirus MAP, les circovirus associés à la maladie de l'amaigrissement du porcelet (MAP) de type A (PCVA) ou de type B (PCVB), ci-après définis par leur séquence génomique, ainsi que  
10 les circovirus dont les séquences nucléiques sont homologues aux séquences des circovirus MAP de type A ou B, tels que notamment les circovirus correspondant à des variants du type A ou du type B.

Par séquence nucléotidique complémentaire d'une séquence de l'invention, on entend tout ADN dont les nucléotides sont complémentaires de ceux de la séquence de  
15 l'invention, et dont l'orientation est inversée (séquence antiparallèle).

On entend par hybridation dans des conditions de stringence avec une séquence nucléotidique selon l'invention, une hybridation dans des conditions de température et de force ionique choisies de telle manière qu'elles permettent le maintien de l'hybridation entre deux fragments d'ADN complémentaires.

20 A titre illustratif, des conditions de forte stringence de l'étape d'hybridation aux fins de définir les fragments nucléotidiques décrits ci-dessus, sont avantageusement les suivantes.

L'hybridation est réalisée à une température préférentielle de 65°C en présence de tampon SSC, 1 x SSC correspondant à 0,15 M NaCl et 0,05 M citrate de Na. Les  
25 étapes de lavage peuvent, par exemple, être les suivantes :

- 2 x SSC, à température ambiante suivi de 2 lavages à 2 x SSC, 0,5 % SDS à 65°C ;  
2 x 0,5 x SSC, 0,5 % SDS ; à 65°C pendant 10 minutes chacun.

Les conditions de stringence intermédiaire, en utilisant par exemple une température de 42°C en présence d'un tampon 2 x SSC, ou de faible stringence, par  
30 exemple une température de 37°C en présence d'un tampon 2 x SSC, requièrent respectivement pour l'hybridation entre les deux séquences une complémentarité globale moins importante.

Les conditions stringentes d'hybridation décrites ci-avant pour un polynucléotide d'une taille d'environ 350 bases, seront adaptées par l'homme du métier pour des oligonucléotides de taille plus grande ou plus petite, selon l'enseignement de Sambrook et al., 1989.

5        Parmi les séquences nucléotidiques selon l'invention, on préfère également celles utilisables comme amorce ou sonde dans des méthodes permettant d'obtenir les séquences homologues selon l'invention, ces méthodes telles que la réaction en chaîne à la polymérase (PCR), le clonage et le séquençage d'acide nucléique étant bien connues de l'homme de l'art.

10       Parmi lesdites séquences nucléotidiques selon l'invention, on préfère encore celles utilisables comme amorce ou sonde dans des méthodes permettant de diagnostiquer la présence de circovirus MAP ou l'un de ses variants telles que définies ci-après.

On préfère également les séquences nucléotidiques selon l'invention capables de  
15       moduler, d'inhiber ou d'induire l'expression de gène de circovirus MAP, et/ou capables de moduler le cycle de répllication de circovirus MAP dans la cellule et/ou l'organisme hôte. On entendra désigner par cycle de répllication, l'invasion, la multiplication de circovirus MAP, et sa propagation cellules hôtes à cellules hôtes dans l'organisme hôte.

20       Parmi lesdites séquences nucléotidiques selon l'invention, on préfère enfin celles correspondant à des cadres ouverts de lecture, dénommés séquences ORF (ORF pour "open reading frame"), et codant pour des polypeptides, telles que par exemple les séquences SEQ ID N° 3 (ORF1), SEQ ID N° 4 (ORF2) et SEQ ID N° 5 (ORF3) correspondant respectivement aux séquences nucléotidiques comprises entre les positions 47 à 985 déterminées par rapport à la position des nucléotides sur la séquence  
25       SEQ ID N° 1, les positions 1723 à 1022 et les positions 658 à 38 par rapport à la position des nucléotides sur la séquence SEQ ID N° 2 (représentée suivant l'orientation 3' → 5'), les extrémités étant comprises, ou encore les séquences SEQ ID N° 11 (ORF'1), SEQ ID N° 12 (ORF'2) et SEQ ID N° 13 (ORF'3), correspondant respectivement aux séquences comprises entre les positions 51 à 995 déterminées par  
30       rapport à la position des nucléotides sur la séquence SEQ ID N° 9, les positions 1734 à 1033 et les positions 670 à 357, les positions étant déterminées par rapport à la position des nucléotides sur la séquence SEQ ID N° 10 (représentée suivant l'orientation 3' →

5'), les extrémités étant comprises.

Les fragments de séquence nucléotidique selon l'invention peuvent être obtenus par exemple par amplification spécifique, telle que la PCR, ou après digestion par des enzymes de restriction appropriées de séquences nucléotidiques selon l'invention, ces méthodes sont en particulier décrites dans l'ouvrage de Sambrook et al., 1989. Cesdits  
5 fragments représentatifs peuvent également être obtenus par synthèse chimique lorsque leur taille n'est pas trop importante et selon des méthodes bien connues de l'homme de l'art.

Par séquence nucléotidique modifiée, on entendra toute séquence nucléotidique  
10 obtenue par mutagenèse selon des techniques bien connues de l'homme de l'art, et comportant des modifications par rapport aux séquences normales selon l'invention, par exemple des mutations dans les séquences régulatrices et/ou promotrices de l'expression de polypeptide, notamment conduisant à une modification du taux d'expression dudit polypeptide ou à une modulation du cycle réplcatif.

15 Par séquence nucléotidique modifiée, on entendra également toute séquence nucléotidique codant pour un polypeptide modifié tel que défini ci-après.

La présente invention a pour objet des séquences nucléotidiques de circovirus MAP selon l'invention, caractérisées en ce qu'elles sont choisies parmi les séquences SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12 , SEQ ID  
20 N° 13 ou un de leurs fragments.

L'invention concerne également les séquences nucléotidiques caractérisées en ce qu'elles comprennent une séquence nucléotidique choisie parmi :

- a) une séquence nucléotidique SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13 ou un de leurs fragments ;
- 25 b) une séquence nucléotidique de fragment spécifique d'une séquence telle que définie en a) ;
- c) une séquence nucléotidique homologue comportant au moins 80 % d'identité avec une séquence telle que définie en a) ou b) ;
- d) une séquence nucléotidique complémentaire ou d'ARN correspondant à  
30 une séquence telle que définie en a), b) ou c) ; et
- e) une séquence nucléotidique modifiée d'une séquence telle que définie en a), b), c), ou d).

En ce qui concerne l'homologie avec les séquences nucléotidiques SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13 ou un de leurs fragments, on préfère les séquences homologues, notamment spécifiques, présentant un pourcentage d'identité avec l'une des séquences SEQ ID N° 3, SEQ ID  
5 N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13 ou un de leurs fragments d'au moins 80 %, de préférence 90 % et 95 %. Lesdites séquences homologues spécifiques peuvent comprendre, par exemple, les séquences correspondant aux séquences ORF1, ORF2, ORF3, ORF'1, ORF'2 et ORF'3 de variant de circovirus MAP de type A ou de type B. Ces séquences homologues spécifiques peuvent de la  
10 même manière correspondre à des variations liées à des mutations au sein des souches de circovirus MAP de type A ou de type B et correspondre notamment à des troncatures, substitutions, délétions et/ou additions d'au moins un nucléotide.

Parmi les séquences nucléotidiques selon l'invention, on préfère notamment la séquence SEQ ID N° 11 qui présente une homologie comportant plus de 80 % d'identité  
15 avec la séquence SEQ ID N° 3, ainsi que la séquence SEQ ID N° 12.

De manière préférée, l'invention est relative aux séquences nucléotidiques selon l'invention, caractérisées en ce qu'elles comprennent une séquence nucléotidique choisie parmi les séquences suivantes :

- a) 170 5' TGTGGCGA 3' ;
- 20 b) 450 5' AGITTCCT 3' ;
- c) 1026 5' TCATTTAGAGGGTCTTTCAG 3' ;
- d) 1074 5' GTCAACCT 3' ;
- e) 1101 5' GTGGTTGC 3' ;
- f) 1123 5' AGCCAGG 3' ;
- 25 g) 1192 5' TTGGCTGG 3' ;
- h) 1218 5' TCTAGCTCTGGT 3' ;
- i) 1501 5' ATCTCAGCTCGT 3' ;
- j) 1536 5' TGTCTCCTCTT 3' ;
- k) 1563 5' TCTCTAGA 3' ;
- 30 l) 1632 5' TGTACCAA 3' ;
- m) 1686 5' TCCGTCTT 3' ; et leur séquence complémentaire.



Dans la liste des séquences nucléotidiques a)-m) ci-dessus, les nucléotides soulignés sont mutés par rapport aux deux séquences connues de circovirus non pathogènes pour le porc. Le nombre précédent la séquence nucléotidique représente la position du premier nucléotide de ladite séquence sur la séquence SEQ ID N° 1.

5 L'invention comprend les polypeptides codés par une séquence nucléotidique selon l'invention, de préférence un polypeptide dont la séquence est représentée par un fragment, notamment spécifique, d'une des 6 séquences d'acides aminés représentées à la figure 2, ces 6 séquences d'acides aminés correspondant aux polypeptides pouvant être codés suivant l'un des 3 cadres de lecture possibles de la séquence SEQ ID N° 1 ou  
10 de la séquence SEQ ID N° 2, ou un polypeptide dont la séquence est représentée par un fragment, notamment spécifique, d'une des 6 séquences d'acides aminés représentées à la figure 8, ces 6 séquences d'acides aminés correspondant aux polypeptides pouvant être codés suivant l'un des 3 cadres de lecture possible de la séquence SEQ ID N° 9 ou de la séquence SEQ ID N° 10.

15 L'invention concerne également les polypeptides caractérisés en ce qu'ils comprennent un polypeptide choisi parmi les séquences d'acides aminés SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16 ou un de leurs fragments.

Parmi les polypeptides selon l'invention, on préfère notamment le polypeptide de  
20 séquence d'acides aminés SEQ ID N° 14 qui présente une homologie comportant plus de 80 % d'identité avec la séquence SEQ ID N° 6, ainsi que le polypeptide de séquence SEQ ID N° 15.

L'invention concerne aussi les polypeptides caractérisés en ce qu'ils comprennent un polypeptide choisi parmi :

- 25 a) un fragment spécifique d'au moins 5 acides aminés d'un polypeptide de séquence d'acides aminés selon l'invention ;  
b) un polypeptide homologue à un polypeptide tel que défini en a) ;  
c) un fragment spécifique biologiquement actif d'un polypeptide tel que défini en a) ou b) ; et  
30 d) un polypeptide modifié d'un polypeptide tel que défini en a), b) ou c).

Parmi les polypeptides selon l'invention, on préfère encore les polypeptides de séquences d'acides aminés SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19 et SEQ ID

N° 20, ces polypeptides étant notamment capables de reconnaître de manière spécifique les anticorps produits lors de l'infection par le circovirus MAP de type B. Ces polypeptides présentent ainsi des épitopes spécifiques du circovirus MAP de type B et peuvent donc en particulier être utilisés dans le domaine diagnostique ou comme agent immunogène pour conférer une protection chez le porc contre l'infection par circovirus MAP, notamment de type B.

Dans la présente description, les termes polypeptide, peptide et protéine sont interchangeables.

Il doit être compris que l'invention ne concerne pas les polypeptides sous forme naturelle, c'est-à-dire qu'ils ne sont pas pris dans leur environnement naturel mais qu'ils ont pu être isolés ou obtenus par purification à partir de sources naturelles, ou bien obtenus par recombinaison génétique, ou encore par synthèse chimique et qu'ils peuvent alors comporter des acides aminés non naturels, comme cela sera décrit ci-après.

Par fragment de polypeptide selon l'invention, on entend désigner un polypeptide comportant au minimum 5 acides aminés, de préférence 10 acides aminés et 15 acides aminés.

Par fragment spécifique de polypeptide, on entend désigner dans la présente invention un fragment de polypeptide codé par une séquence nucléotidique de fragment spécifique selon l'invention.

Par polypeptide homologue, on entendra désigner les polypeptides présentant, par rapport au polypeptide naturel, certaines modifications comme en particulier une délétion, addition ou substitution d'au moins un acide aminé, une troncation, un allongement, une fusion chimérique, et/ou une mutation. Parmi les polypeptides homologues, on préfère ceux dont la séquence d'acides aminés présente au moins 80 %, de préférence 90 %, d'homologie avec les séquences d'acides aminés des polypeptides selon l'invention.

Par polypeptide homologue spécifique, on entendra désigner les polypeptides homologues tels que définis précédemment et présentant un fragment spécifique de polypeptide selon l'invention.

Dans le cas d'une substitution, un ou plusieurs acides aminés consécutifs ou non consécutifs, sont remplacés par des acides aminés "équivalents". L'expression acide

aminé "équivalent" vise ici à désigner tout acide aminé susceptible d'être substitué à l'un des acides aminés de la structure de base sans cependant modifier essentiellement les activités biologiques des peptides correspondants et telles qu'elles seront définies par la suite.

- 5           Ces acides aminés équivalents peuvent être déterminés soit en s'appuyant sur leur homologie de structure avec les acides aminés auxquels ils se substituent, soit sur des résultats d'essais comparatifs d'activité biologique entre les différents polypeptides susceptibles d'être effectués.

10           A titre d'exemple, on mentionnera les possibilités de substitutions susceptibles d'être effectuées sans qu'il en résulte une modification approfondie de l'activité biologique des polypeptides modifiés correspondants, les remplacements, par exemple, de la leucine par la valine ou l'isoleucine, de l'acide aspartique par l'acide glutamique, de la glutamine par l'asparagine, de l'arginine par la lysine etc., les substitutions inverses étant naturellement envisageables dans les mêmes conditions.

- 15           Les polypeptides homologues spécifiques correspondent également aux polypeptides codés par les séquences nucléotidiques homologues spécifiques telles que définies précédemment et comprennent ainsi dans la présente définition les polypeptides mutés ou correspondant à des variants, pouvant exister chez circovirus MAP, et qui correspondent notamment à des troncatures, substitutions, délétions et/ou additions d'au  
20 moins un résidu d'acide aminé.

Par fragment spécifique biologiquement actif d'un polypeptide selon l'invention, on entendra désigner en particulier un fragment spécifique de polypeptide, tel que défini ci-avant, présentant au moins une des caractéristiques des polypeptides selon l'invention, notamment en ce qu'il est :

- 25           - capable d'induire une réaction d'immunogénicité dirigée contre un circovirus MAP ;  
              et/ou  
              - capable d'être reconnu par un anticorps spécifique d'un polypeptide selon l'invention ; et/ou  
              - capable de se lier à un polypeptide ou à une séquence nucléotidique de circovirus  
30           MAP ; et/ou  
              - capable d'exercer une activité physiologique, même partielle, telle que par exemple une activité de dissémination ou structurelle (capside) ; et/ou

- capable de moduler, d'induire ou d'inhiber l'expression de gène de circovirus MAP ou l'un de ses variants, et/ou capable de moduler le cycle de réplication de circovirus MAP dans la cellule et/ou l'organisme hôte.

Les fragments de polypeptide selon l'invention peuvent correspondre à des fragments isolés ou purifiés naturellement présents dans un circovirus MAP ou correspondre à des fragments pouvant être obtenus par clivage dudit polypeptide par une enzyme protéolytique, telle que la trypsine ou la chymotrypsine ou la collagénase, ou par un réactif chimique, tel que le bromure de cyanogène (CNBr) ou encore en plaçant ledit polypeptide dans un environnement très acide, par exemple à pH 2,5. De tels fragments polypeptidiques peuvent être également préparés indifféremment par synthèse chimique, à partir d'hôtes transformés par un vecteur d'expression selon l'invention contenant un acide nucléique permettant l'expression desdits fragments, placé sous le contrôle des éléments de régulation et/ou d'expression appropriés.

Par "polypeptide modifié" d'un polypeptide selon l'invention, on entend désigner un polypeptide obtenu par recombinaison génétique ou par synthèse chimique comme cela sera décrit ci-après, présentant au moins une modification par rapport à la séquence normale. Ces modifications pourront notamment porter sur des acides aminés à l'origine d'une spécificité, de la pathogénicité et/ou de virulence, ou à l'origine de la conformation structurale, et de la capacité d'insertion membranaire du polypeptide selon l'invention. On pourra ainsi créer des polypeptides d'activité équivalente, augmentée ou diminuée, et de spécificité équivalente, plus étroite, ou plus large. Parmi les polypeptides modifiés, il faut citer les polypeptides dans lesquels jusqu'à 5 acides aminés peuvent être modifiés, tronqués à l'extrémité N- ou C-terminale, ou bien délétés, ou bien ajoutés.

Comme cela est indiqué, les modifications du polypeptide auront pour objectif notamment :

- de le rendre capable de moduler, d'inhiber ou d'induire l'expression de gène de circovirus MAP et/ou capable de moduler le cycle de réplication de circovirus MAP dans la cellule et/ou l'organisme hôte,
- de permettre son incorporation dans des compositions vaccinales,
- de modifier sa biodisponibilité en tant que composé à usage thérapeutique.

Les méthodes permettant de mettre en évidence lesdites modulations sur des cellules eucaryotes ou procaryotes sont bien connues de l'homme de l'art. Il est également bien entendu que les séquences nucléotidiques codant pour lesdits polypeptides modifiés pourront être utilisées pour lesdites modulations, par exemple par l'intermédiaire de vecteurs selon l'invention et décrits ci-après, afin, par exemple, de prévenir ou de traiter les pathologies liées à l'infection.

Les polypeptides modifiés précédents peuvent être obtenus en utilisant la chimie combinatoire, dans laquelle il est possible de faire varier systématiquement des parties de polypeptide avant de les tester sur des modèles, cultures cellulaires ou des micro-organismes par exemple, pour sélectionner les composés les plus actifs ou présentant les propriétés recherchées.

La synthèse chimique présente également l'avantage de pouvoir utiliser :

- des acides aminés non naturels, ou
- des liaisons non peptidiques.

Ainsi, afin d'améliorer la durée de vie des polypeptides selon l'invention, il pourra être intéressant d'utiliser des acides aminés non naturels, par exemple sous forme D, ou bien des analogues d'acides aminés, notamment des formes soufrées par exemple.

Enfin, la structure des polypeptides selon l'invention, ses formes homologues spécifiques ou modifiées, pourra être intégrée dans des structures chimiques de type polypeptidique ou autres. Ainsi, il pourra être intéressant de prévoir aux extrémités N- et C-terminales des composés non reconnus par les protéases.

Font également partie de l'invention les séquences nucléotidiques codant pour un polypeptide selon l'invention.

L'invention concerne également des séquences nucléotidiques utilisables comme amorce ou sonde, caractérisées en ce que lesdites séquences sont choisies parmi les séquences nucléotidiques selon l'invention.

Parmi les couples de séquences nucléotidiques utilisables comme couple d'amorces selon l'invention, on préfère les couples d'amorces choisis parmi les couples suivants :

- a) 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3', et  
5' TGG AAT GTT AAC GAG CTG AG 3';
- b) 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3', et

- 5' CTC GCA GCC ATC TTG GAA TG 3' ;
- c) 5' CGC GCG TAA TAC GAC TCA CT 3', et  
5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3' ;
- d) 5' CGC GCG TAA TAC GAC TCA CT 3', et  
5' CTC GCA GCC ATC TTG GAA TG 3' ; et
- e) 5' CCT GTC TAC TGC TGT GAG TAC CTT GT 3', et  
5' GCA GTA GAC AGG TCA CTC CGT TGT CC 3'.

Le clonage et le séquençage du circovirus MAP, type A et B, a permis d'identifier, après analyse comparative avec les séquences nucléotidiques des autres circovirus porcins, quelles étaient parmi les séquences de fragments de ces acides nucléiques, celles qui sont strictement spécifiques du circovirus MAP de type A, de type B ou de type A et B, et celles qui correspondent à une séquence consensus de circovirus porcins autres que les circovirus MAP de type A et/ou B .

Un grand besoin existe également de pouvoir disposer de séquences nucléotidiques utilisables comme amorce ou sonde spécifiques de l'ensemble de circovirus porcins autres connus et non pathogènes.

Cesdites séquences nucléotidiques consensus spécifiques de l'ensemble de circovirus, autres que circovirus MAP de type A et B, sont facilement identifiables à partir de la figure 3 et de la séquence SEQ ID N° 9, et font partie de l'invention.

Parmi cesdites séquences nucléotidiques consensus, on préfère celle caractérisée en ce qu'elle fait partie du couple d'amorces suivant :

- a) 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3', et  
5' TGG AAT GTT AAC TAC CTC AA 3'.

L'invention comprend également une séquence nucléotidique selon l'invention, caractérisée en ce que ladite séquence est une séquence consensus spécifique de circovirus porcin autre que circovirus MAP de type B et en ce qu'elle est l'une des amorces du couple d'amorces suivant :

- a) 5' GGC GGC GCC ATC TGT AAC GGT TT 3', et  
5' GAT GGC GCC GAA AGA CGG GTA TC 3'.

Il est bien entendu que la présente invention a également pour objet les polypeptides spécifiques de circovirus porcins connus autres que circovirus MAP, codés par lesdites séquences nucléotidiques consensus, susceptibles d'être obtenus par

purification à partir des polypeptides naturels, par recombinaison génétique ou par synthèse chimique par des procédés bien connus de l'homme de l'art et tels que décrits notamment ci-après. De la même manière, les anticorps mono ou polyclonaux, marqués ou non marqués dirigés contre lesdits polypeptides spécifiques codés par lesdites séquences nucléotidiques consensus, font aussi partie de l'invention.

Lesdites séquences nucléotidiques consensus, lesdits polypeptides correspondants ainsi que lesdits anticorps dirigés contre lesdits polypeptides, pourront être utilisés dans des procédés ou nécessaires de détection et/ou d'identification tels que décrits ci-après, à la place ou en outre des séquences nucléotidiques, des polypeptides ou des anticorps selon l'invention, spécifiques de circovirus MAP type A et/ou B.

Ces protocoles ont été améliorés pour détecter de façon différentielle les formes monomériques circulaires de formes répliquatives spécifiques du virion ou de l'ADN en répliquant et les formes dimériques retrouvées dans les constructions moléculaires dites en tandem.

L'invention concerne en outre l'utilisation d'une séquence nucléotidique selon l'invention, comme amorce ou sonde, pour la détection et/ou l'amplification de séquences d'acide nucléique.

Les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent ainsi être utilisées pour amplifier des séquences nucléotidiques, notamment par la technique PCR (réaction en chaîne à la polymérase) (Erllich, 1989 ; Innis et al., 1990 ; Rolfs et al., 1991 ; et White et al., 1997).

Ces amorces oligodésoxyribonucléotidiques ou oligo-ribonucléotidiques ont avantageusement une longueur d'au moins 8 nucléotides, de préférence d'au moins 12 nucléotides, et encore plus préférentiellement au moins 20 nucléotides.

D'autres techniques d'amplification de l'acide nucléique cible peuvent être avantageusement employées comme alternatives à la PCR.

Les séquences nucléotidiques de l'invention, en particulier les amorces selon l'invention, peuvent également être mises en oeuvre dans d'autres procédés d'amplification d'un acide nucléique cible, tels que :

- la technique TAS (Transcription-based Amplification System), décrite par Kwoh et al. en 1989 ;

- la technique 3SR (Self-Sustained Sequence Replication), décrite par Guatelli et al. en 1990 ;
- la technique NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification), décrite par Kievitis et al. en 1991 ;
- 5 - la technique SDA (Strand Displacement Amplification) ou technique d'amplification à déplacement de brin (Walker et al., 1992) ;
- la technique TMA (Transcription Mediated Amplification).

Les polynucléotides de l'invention peuvent aussi être employés dans des techniques d'amplification ou de modification de l'acide nucléique servant de sonde,  
10 telles que :

- la technique LCR (Ligase Chain Reaction), décrite par Landegren et al. en 1988 et perfectionnée par Barany et al. en 1991, qui emploie une ligase thermostable ;
- la technique de RCR (Repair Chain Reaction), décrite par Segev en 1992 ;
- la technique CPR (Cycling Probe Reaction), décrite par Duck et al. en 1990 ;
- 15 - la technique d'amplification à la Q-beta-réplique, décrite par Miele et al. en 1983 et perfectionnée notamment par Chu et al. en 1986, Lizardi et al. en 1988, puis par Burg et al. ainsi que par Stone et al. en 1996.

Dans le cas où éventuellement le polynucléotide cible à détecter est un ARN, par exemple un ARNm, on pourra utiliser, préalablement à la mise en oeuvre d'une réaction  
20 d'amplification à l'aide d'au moins une amorce selon l'invention ou à la mise en oeuvre d'un procédé de détection à l'aide d'au moins une sonde de l'invention, une enzyme de type transcriptase inverse afin d'obtenir un ADNc à partir de l'ARN contenu dans l'échantillon biologique. L'ADNc obtenu servira alors de cible pour la ou les amorces ou la ou les sondes mises en oeuvre dans le procédé d'amplification ou de détection  
25 selon l'invention.

La sonde de détection sera choisie de telle manière à ce qu'elle hybride avec la séquence cible ou l'amplicon généré à partir de la séquence cible. Une telle sonde de détection aura avantageusement pour séquence une séquence d'au moins 12 nucléotides, en particulier d'au moins 20 nucléotides, et de préférence d'au moins 100 nucléotides.

30 L'invention comprend aussi les séquences nucléotidiques utilisables comme sonde ou amorce selon l'invention, caractérisées en ce qu'elles sont marquées par un composé radioactif ou par un composé non radioactif.



Les séquences nucléotidiques non marquées peuvent être utilisées directement comme sondes ou amorces, cependant les séquences sont généralement marquées par un élément radioactif ( $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ) ou par une molécule non radioactive (biotine, acétylaminofluorène, digoxigénine, 5-bromo-désoxyuridine, fluorescéine) pour obtenir  
5 des sondes utilisables pour de nombreuses applications.

Des exemples de marquage non radioactifs de séquences nucléotidiques sont décrits, par exemple, dans le brevet français N° 78.10975 ou par Urdea et al. ou par Sanchez-Pescador et al. en 1988.

Dans ce dernier cas, on pourra aussi utiliser l'une des méthodes de marquage  
10 décrites dans les brevets FR-2 422 956 et FR-2 518 755.

La technique d'hybridation peut être réalisée de manières diverses (Matthews et al., 1988). La méthode la plus générale consiste à immobiliser l'acide nucléique extrait des cellules sur un support (tel que nitro-cellulose, nylon, polystyrène) et à incubé, dans des conditions bien définies, l'acide nucléique cible immobilisé avec la sonde.  
15 Après l'hybridation, l'excès de sonde est éliminé et les molécules hybrides formées sont détectées par la méthode appropriée (mesure de la radioactivité, de la fluorescence ou de l'activité enzymatique liée à la sonde).

L'invention comprend également les séquences nucléotidiques selon l'invention, caractérisées en ce qu'elles sont immobilisées sur un support, de manière covalente ou  
20 non covalente.

Selon un autre mode avantageux de mise en oeuvre des séquences nucléotidiques selon l'invention, ces dernières peuvent être utilisées immobilisées sur un support et servir ainsi à capturer par hybridation spécifique l'acide nucléique cible obtenu à partir de l'échantillon biologique à tester. Si nécessaire, le support solide est  
25 séparé de l'échantillon et le complexe d'hybridation formé entre la sonde dite de capture et l'acide nucléique cible est ensuite détecté grâce à une seconde sonde, dite sonde de détection, marquée par un élément facilement détectable.

Un autre objet de la présente invention est un vecteur pour le clonage et/ou l'expression d'une séquence, caractérisé en ce qu'il contient une séquence nucléotidique  
30 selon l'invention.

Les vecteurs selon l'invention, caractérisés en ce qu'ils comportent les éléments permettant l'expression et/ou la sécrétion desdites séquences nucléotidiques dans une cellule hôte déterminée, font également partie de l'invention.

Le vecteur doit alors comporter un promoteur, des signaux d'initiation et de terminaison de la traduction, ainsi que des régions appropriées de régulation de la transcription. Il doit pouvoir être maintenu de façon stable dans la cellule hôte et peut éventuellement posséder des signaux particuliers spécifiant la sécrétion de la protéine traduite. Ces différents éléments sont choisis en fonction de l'hôte cellulaire utilisé. A cet effet, les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent être insérées dans des vecteurs à réplication autonome au sein de l'hôte choisi, ou des vecteurs intégratifs de l'hôte choisi.

De tels vecteurs seront préparés selon les méthodes couramment utilisées par l'homme du métier, et les clones en résultant pourront être introduits dans un hôte approprié par des méthodes standard, telles que par exemple la lipofection, l'électroporation, le choc thermique.

Les vecteurs selon l'invention sont par exemple des vecteurs d'origine plasmidique ou virale.

Un vecteur préféré pour l'expression des polypeptides de l'invention est le baculovirus.

On préfère également le vecteur pBS KS dans lequel est inséré la séquence d'ADN en tandem du circovirus MAP type A (ou DFP) et tel que déposé à la CNCM le 3 juillet 1997, sous le numéro I-1891.

Ces vecteurs sont utiles pour transformer des cellules hôtes afin de cloner ou d'exprimer les séquences nucléotidiques de l'invention.

L'invention comprend également les cellules hôtes transformées par un vecteur selon l'invention.

Ces cellules peuvent être obtenues par l'introduction dans des cellules hôtes d'une séquence nucléotidique insérée dans un vecteur tel que défini ci-dessus, puis la mise en culture desdites cellules dans des conditions permettant la réplication et/ou l'expression de la séquence nucléotidique transfectée.

L'hôte cellulaire peut être choisi parmi des systèmes procaryotes ou eucaryotes, comme par exemple les cellules bactériennes (Olins et Lee, 1993), mais également les

cellules de levure (Buckholz, 1993), de même que les cellules animales, en particulier les cultures de cellules de mammifères (Edwards et Aruffo, 1993), et notamment les cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO), mais également les cellules d'insectes dans lesquelles on peut utiliser des procédés mettant en oeuvre des baculovirus par exemple  
5 (Luckow, 1993).

Une cellule hôte préférée pour l'expression des protéines de l'invention est constituée par les cellules d'insectes sf9.

Une cellule hôte encore préférée selon l'invention est E-coli, telle que déposée à la CNCM le 3 juillet 1997, sous le numéro I-1891.

10 L'invention concerne également les animaux, comprenant une desdites cellules transformées selon l'invention.

L'obtention d'animaux transgéniques selon l'invention surexprimant un ou plusieurs des gènes de circovirus MAP ou partie de gènes sera menée de façon préférée sur des rats, des souris ou des lapins selon des méthodes bien connues de l'homme de l'art telles que par transfections, virales ou non virales. Les animaux transgéniques surexprimant l'un ou plusieurs desdits gènes pourront être obtenus par transfection de copies multiples desdits gènes sous contrôle d'un promoteur puissant de nature ubiquitaire, ou sélectif d'un type de tissu. Les animaux transgéniques pourront être également obtenus par recombinaison homologue sur cellules souches embryonnaires,  
15 transfert de ces cellules souches à des embryons, sélection des chimères affectées au niveau des lignées reproductrices, et croissance desdites chimères.

Les cellules transformées ainsi que les animaux transgéniques selon l'invention sont utilisables dans des procédés de préparation de polypeptide recombinant.

Il est aujourd'hui possible de produire des polypeptides recombinants en quantité relativement importante par génie génétique en utilisant les cellules transformées par des vecteurs d'expression selon l'invention ou en utilisant des animaux transgéniques selon l'invention.  
25

Les procédés de préparation d'un polypeptide de l'invention sous forme recombinante, caractérisés en ce qu'ils mettent en oeuvre un vecteur et/ou une cellule transformée par un vecteur selon l'invention et/ou un animal transgénique comprenant  
30 une desdites cellules transformées selon l'invention, sont eux-mêmes compris dans la présente invention.

Parmi lesdits procédés de préparation d'un polypeptide de l'invention sous forme recombinante, on préfère les procédés de préparation mettant en oeuvre un vecteur, et/ou une cellule transformée par ledit vecteur et/ou un animal transgénique comprenant une desdites cellules transformées, contenant une séquence nucléotidique selon l'invention codant pour un polypeptide de circovirus MAP.

Les polypeptides recombinants obtenus comme indiqué ci-dessus, peuvent aussi bien se présenter sous forme glycosylée que non glycosylée et peuvent présenter ou non la structure tertiaire naturelle.

Une variante préférée consiste à produire un polypeptide recombinant fusionné à une protéine "porteuse" (protéine chimère). L'avantage de ce système est qu'il permet une stabilisation et une diminution de la protéolyse du produit recombinant, une augmentation de la solubilité au cours de la renaturation in vitro et/ou une simplification de la purification lorsque le partenaire de fusion possède une affinité pour un ligand spécifique.

Plus particulièrement, l'invention concerne un procédé de préparation d'un polypeptide de l'invention comprenant les étapes suivantes :

- a) culture des cellules transformées dans des conditions permettant l'expression d'un polypeptide recombinant de séquence nucléotidique selon l'invention ;
- b) le cas échéant, récupération dudit polypeptide recombinant.

Lorsque le procédé de préparation d'un polypeptide de l'invention met en oeuvre un animal transgénique selon l'invention, le polypeptide recombinant est ensuite extrait dudit animal.

L'invention a aussi pour objet un polypeptide susceptible d'être obtenu par un procédé de l'invention tel que décrit précédemment.

L'invention comprend aussi un procédé de préparation d'un polypeptide synthétique, caractérisé en ce qu'il utilise une séquence d'acides aminés de polypeptides selon l'invention.

L'invention concerne également un polypeptide synthétique obtenu par un procédé selon l'invention.

Les polypeptides selon l'invention peuvent également être préparés par les techniques classiques, dans le domaine de la synthèse des peptides. Cette synthèse peut être réalisée en solution homogène ou en phase solide.

Par exemple, on aura recours à la technique de synthèse en solution homogène décrite par Houbenweyl en 1974.

Cette méthode de synthèse consiste à condenser successivement deux à deux les acides aminés successifs dans l'ordre requis, ou à condenser des acides aminés et des fragments préalablement formés et contenant déjà plusieurs acides aminés dans l'ordre approprié, ou encore plusieurs fragments préalablement ainsi préparés, étant entendu que l'on aura eu soin de protéger au préalable toutes les fonctions réactives portées par ces acides aminés ou fragments, à l'exception des fonctions amines de l'un et carboxyles de l'autre ou vice-versa, qui doivent normalement intervenir dans la formation des liaisons peptidiques, notamment après activation de la fonction carboxyle, selon les méthodes bien connues dans la synthèse des peptides.

Selon une autre technique préférée de l'invention, on a recours à celle décrite par Merrifield.

Pour fabriquer une chaîne peptidique selon le procédé de Merrifield, on a recours à une résine polymère très poreuse, sur laquelle on fixe le premier acide aminé C-terminal de la chaîne. Cet acide aminé est fixé sur une résine par l'intermédiaire de son groupe carboxylique et sa fonction amine est protégée. On fixe ainsi, les uns après les autres, les acides aminés qui vont constituer la chaîne peptidique sur le groupe amine chaque fois déprotégé au préalable de la portion de la chaîne peptidique déjà formée, et qui est rattachée à la résine. Lorsque la totalité de la chaîne peptidique désirée est formée, on élimine les groupes protecteurs des différents acides aminés constituant la chaîne peptidique et on détache le peptide de la résine à l'aide d'un acide.

L'invention est en outre relative à des polypeptides hybrides présentant au moins un polypeptide selon l'invention, et une séquence d'un polypeptide susceptible d'induire une réponse immunitaire chez l'homme ou l'animal.

Avantageusement, le déterminant antigénique est tel qu'il est susceptible d'induire une réponse humorale et/ou cellulaire.

Un tel déterminant pourra comprendre un polypeptide selon l'invention sous forme glycosylée utilisé en vue d'obtenir des compositions immunogènes susceptibles d'induire la synthèse d'anticorps dirigés contre des épitopes multiples. Lesdits polypeptides ou leurs fragments glycosylés font également partie de l'invention.

Ces molécules hybrides peuvent être constituées en partie d'une molécule porteuse de polypeptides ou de leurs fragments selon l'invention, associée à une partie éventuellement immunogène, en particulier un épitope de la toxine diphtérique, la toxine tétanique, un antigène de surface du virus de l'hépatite B (brevet FR 79 21811),  
5 l'antigène VPI du virus de la poliomyélite ou toute autre toxine ou antigène viral ou bactérien.

Les procédés de synthèse des molécules hybrides englobent les méthodes utilisées en génie génétique pour construire des séquences nucléotidiques hybrides codant pour les séquences polypeptidiques recherchées. On pourra, par exemple, se  
10 référer avantageusement à la technique d'obtention de gènes codant pour des protéines de fusion décrite par Minton en 1984.

Lesdites séquences nucléotidiques hybrides codant pour un polypeptide hybride ainsi que les polypeptides hybrides selon l'invention caractérisés en ce qu'il s'agit de polypeptides recombinants obtenus par l'expression desdites séquences nucléotidiques  
15 hybrides, font également partie de l'invention.

L'invention comprend également les vecteurs caractérisés en ce qu'ils contiennent une desdites séquences nucléotidiques hybrides. Les cellules hôtes transformées par lesdits vecteurs, les animaux transgéniques comprenant une desdites cellules transformées ainsi que les procédés de préparation de polypeptides  
20 recombinants utilisant lesdits vecteurs, lesdites cellules transformées et/ou lesdits animaux transgéniques font bien entendu également partie de l'invention.

Les polypeptides selon l'invention, les anticorps selon l'invention ci-après décrits et les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent avantageusement être mis en oeuvre dans des procédés pour la détection et/ou l'identification de circovirus  
25 MAP, ou de circovirus porcin autre qu'un circovirus MAP, dans un échantillon biologique (tissu ou fluide biologique) susceptible de les contenir. Ces procédés, suivant la spécificité des polypeptides, des anticorps et des séquences nucléotidiques selon l'invention qui seront utilisés, pourront en particulier détecter et/ou identifier un circovirus MAP ou un circovirus porcin autre qu'un circovirus MAP ou autre que le  
30 circovirus MAP de type B .

Les polypeptides selon l'invention peuvent avantageusement être mis en oeuvre dans un procédé pour la détection et/ou l'identification de circovirus MAP de type A, de

type B, de type A ou B, de circovirus porcin autre que le circovirus MAP de type B, ou de circovirus porcin autre que le circovirus MAP de type A ou B, dans un échantillon biologique (tissu ou fluide biologique) susceptible de les contenir, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 5 a) mise en contact de cet échantillon biologique avec un polypeptide ou un de ses fragments selon l'invention (dans des conditions permettant une réaction immunologique entre ledit polypeptide et les anticorps éventuellement présents dans l'échantillon biologique) ;
- b) mise en évidence des complexes antigène-anticorps éventuellement formés.

10 Dans la présente description, on entendra désigner par circovirus MAP, sauf si une mention particulière est indiquée, un circovirus MAP de type A ou de type B, et par circovirus porcin autre que MAP, sauf si une mention particulière est indiquée, un circovirus porcin autre qu'un circovirus MAP de type A et B.

De préférence, l'échantillon biologique est constitué par un fluide, par exemple  
15 un sérum de porc, du sang total ou des biopsies.

Toute procédure classique peut être mise en oeuvre pour réaliser une telle détection des complexes antigène-anticorps éventuellement formés.

A titre d'exemple, une méthode préférée met en jeu des processus immunoenzymatiques selon la technique ELISA, par immunofluorescence, ou radio-  
20 immunologiques (RIA) ou équivalent.

Ainsi, l'invention concerne également les polypeptides selon l'invention, marqués à l'aide d'un marqueur adéquat tel que du type enzymatique, fluorescent, radioactif.

De telles méthodes comprennent par exemple les étapes suivantes :

- 25 - dépôt de quantités déterminées d'une composition polypeptidique selon l'invention dans les puits d'une plaque de microtitration,
- introduction dans lesdits puits de dilutions croissantes de sérum, ou d'échantillon biologique autre tel que défini précédemment, devant être analysé,
- incubation de la microplaque,
- 30 - introduction dans les puits de la plaque de micro-titration d'anticorps marqués dirigés contre des immunoglobulines de porc, le marquage de ces anticorps ayant été réalisé à l'aide d'une enzyme sélectionnée parmi celles qui sont capables

d'hydrolyser un substrat en modifiant l'absorption des radiations de ce dernier, au moins à une longueur d'onde déterminée, par exemple à 550 nm,

- détection, en comparaison avec un témoin de contrôle, de la quantité de substrat hydrolysé.

5 L'invention concerne également un kit ou nécessaire pour la détection et/ou l'identification de circovirus MAP, de circovirus porcin autre qu'un circovirus MAP ou de circovirus porcin autre que le circovirus MAP de type B, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :

- un polypeptide selon l'invention,
- 10 - le cas échéant, les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réaction immunologique ou spécifique,
- le cas échéant, les réactifs permettant la détection des complexes antigène-anticorps produits par la réaction immunologique entre le ou les polypeptides de l'invention et les anticorps éventuellement présents dans l'échantillon biologique, ces
- 15 réactifs pouvant également porter un marqueur, ou être susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué, plus particulièrement dans le cas où le polypeptide selon l'invention n'est pas marqué,
- le cas échéant, un échantillon biologique de référence (témoin négatif) dépourvu d'anticorps reconnus par un polypeptide selon l'invention,
- 20 - le cas échéant, un échantillon biologique de référence (témoin positif) contenant une quantité prédéterminée d'anticorps reconnus par un polypeptide selon l'invention.

Les polypeptides selon l'invention permettent de préparer des anticorps monoclonaux ou polyclonaux caractérisés en ce qu'ils reconnaissent spécifiquement les

25 polypeptides selon l'invention. Les anticorps monoclonaux pourront avantageusement être préparés à partir d'hybridomes selon la technique décrite par Kohler et Milstein en 1975. Les anticorps polyclonaux pourront être préparés, par exemple, par immunisation d'un animal, en particulier une souris, avec un polypeptide ou un ADN selon l'invention associé à un adjuvant de la réponse immunitaire, puis purification des anticorps

30 spécifiques contenus dans le sérum des animaux immunisés sur une colonne d'affinité sur laquelle a préalablement été fixé le polypeptide ayant servi d'antigène. Les anticorps polyclonaux selon l'invention peuvent aussi être préparés par purification, sur une



colonne d'affinité, sur laquelle a préalablement été immobilisé un polypeptide selon l'invention, des anticorps contenus dans le sérum de porcs infectés par un circovirus MAP.

L'invention a également pour objet des anticorps mono ou polyclonaux ou leurs  
5 fragments, ou anticorps chimériques, caractérisés en ce qu'ils sont capables de reconnaître spécifiquement un polypeptide selon l'invention.

Les anticorps de l'invention pourront également être marqués de la même manière que décrit précédemment pour les sondes nucléiques de l'invention tels qu'un marquage de type enzymatique, fluorescent ou radioactif.

10 L'invention vise en outre un procédé pour la détection et/ou l'identification de circovirus MAP, de circovirus porcin autre qu'un circovirus MAP, ou autre que le circovirus MAP de type B, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) mise en contact de l'échantillon biologique (tissu ou fluide biologique)  
15 avec un anticorps mono ou polyclonal selon l'invention (dans des conditions permettant une réaction immunologique entre lesdits anticorps et les polypeptides de circovirus MAP, de circovirus porcin autre qu'un circovirus MAP, de circovirus porcin autre que le circovirus MAP de type B, éventuellement présents dans l'échantillon biologique) ;

b) mise en évidence du complexe antigène-anticorps éventuellement formé.

20 Entre également dans le cadre de l'invention, un kit ou nécessaire pour la détection et/ou l'identification de circovirus MAP, de circovirus porcin autre qu'un circovirus MAP ou de circovirus porcin autre que le circovirus MAP de type B, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :

- un anticorps polyclonal ou monoclonal selon l'invention, le cas échéant  
25 marqué ;

- le cas échéant, un réactif pour la constitution du milieu propice à la réalisation de la réaction immunologique ;

- le cas échéant, un réactif permettant la détection des complexes antigène-anticorps produits par la réaction immunologique, ce réactif pouvant également porter  
30 un marqueur, ou être susceptible d'être reconnu à son tour par un réactif marqué, plus particulièrement dans le cas où ledit anticorps monoclonal ou polyclonal n'est pas marqué ;

- le cas échéant, des réactifs pour effectuer la lyse des cellules de l'échantillon testé.

La présente invention a également pour objet un procédé pour la détection et/ou l'identification de MAP, de circovirus porcin autre qu'un circovirus MAP ou de  
5 circovirus porcin autre que le circovirus MAP de type B, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il met en oeuvre une séquence nucléotidique selon l'invention.

Plus particulièrement, l'invention concerne un procédé pour la détection et/ou l'identification de circovirus MAP, de circovirus porcin autre qu'un circovirus MAP ou  
10 de circovirus porcin autre que le circovirus MAP de type B, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

- a) le cas échéant, isolement de l'ADN à partir de l'échantillon biologique à analyser ;
- b) amplification spécifique de l'ADN de l'échantillon à l'aide d'au moins  
15 une amorce, ou un couple d'amorces, selon l'invention ;
- c) mise en évidence des produits d'amplification.

Ceux-ci peuvent être détectés par exemple par la technique d'hybridation moléculaire en utilisant une sonde nucléique selon l'invention. Cette sonde sera  
avantageusement marquée par un élément non radioactif (sonde froide) ou radioactif.

20 Aux fins de la présente invention, on entendra par "ADN de l'échantillon biologique" ou "ADN contenu dans l'échantillon biologique", soit l'ADN présent dans l'échantillon biologique considéré, soit éventuellement l'ADNc obtenu après l'action d'une enzyme de type transcriptase inverse sur l'ARN présent dans ledit échantillon biologique.

25 Un autre but de la présente invention consiste en un procédé selon l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) mise en contact d'une sonde nucléotidique selon l'invention avec un échantillon biologique, l'ADN contenu dans l'échantillon biologique ayant, le cas  
échéant, préalablement été rendu accessible à l'hybridation, dans des conditions  
30 permettant l'hybridation de la sonde à l'ADN de l'échantillon ;
- b) mise en évidence de l'hybride formé entre la sonde nucléotidique et l'ADN de l'échantillon biologique.

La présente invention concerne aussi un procédé selon l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

5 a) mise en contact d'une sonde nucléotidique immobilisée sur un support selon l'invention avec un échantillon biologique, l'ADN de l'échantillon ayant, le cas échéant, été préalablement rendu accessible à l'hybridation, dans des conditions permettant l'hybridation de la sonde à l'ADN de l'échantillon ;

b) mise en contact de l'hybride formé entre la sonde nucléotidique immobilisée sur un support et l'ADN contenu dans l'échantillon biologique, le cas échéant après élimination de l'ADN de l'échantillon biologique n'ayant pas hybridé  
10 avec la sonde, avec une sonde nucléotidique marquée selon l'invention ;

c) mise en évidence du nouvel hybride formé à l'étape b).

Selon un mode de réalisation avantageux du procédé pour la détection et/ou l'identification défini précédemment, celui-ci est caractérisé en ce que, pré-alablement à l'étape a), l'ADN de l'échantillon biologique est préalablement amplifié à l'aide d'au  
15 moins une amorce selon l'invention.

L'invention vise en outre un kit ou nécessaire pour la détection et/ou l'identification de circovirus MAP, de circovirus porcin autre que le circovirus MAP ou de circovirus porcin autre que le circovirus MAP de type B, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :

20 a) une sonde nucléotidique selon l'invention ;

b) le cas échéant, les réactifs nécessaires à la mise en oeuvre d'une réaction d'hybridation ;

c) le cas échéant, au moins une amorce selon l'invention ainsi que les réactifs nécessaires à une réaction d'amplification de l'ADN.

25 L'invention concerne également un kit ou nécessaire pour la détection et/ou l'identification de circovirus MAP, de circovirus porcin autre qu'un circovirus MAP ou de circovirus porcin autre que le circovirus MAP de type B, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :

a) une sonde nucléotidique, dite sonde de capture, selon l'invention ;

30 b) une sonde oligonucléotidique, dite sonde de révélation, selon l'invention ;

c) le cas échéant, au moins une amorce selon l'invention ainsi que les réactifs nécessaires à une réaction d'amplification de l'ADN.

L'invention est relative aussi à un kit ou nécessaire pour la détection et/ou l'identification de circovirus MAP, de circovirus porcin autre qu'un circovirus MAP ou  
5 de circovirus porcin autre que le circovirus MAP de type B, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :

- a) au moins une amorce selon l'invention ;
- b) le cas échéant, les réactifs nécessaires pour effectuer une réaction d'amplification d'ADN ;
- 10 c) le cas échéant, un composant permettant de vérifier la séquence du fragment amplifié, plus particulièrement une sonde oligonucléotidique selon l'invention.

L'invention concerne en outre l'utilisation d'une séquence nucléotidique selon l'invention, d'un polypeptide selon l'invention, d'un anticorps selon l'invention, d'une  
15 cellule selon l'invention, et/ou d'un animal transformé selon l'invention, pour la sélection de composé organique ou inorganique capable de moduler, d'induire ou d'inhiber l'expression de gènes, et/ou de modifier la réplication cellulaire de circovirus MAP ou capable d'induire ou d'inhiber les pathologies liées à une infection par un circovirus MAP.

20 L'invention comprend également une méthode de sélection de composés capables de se lier à un polypeptide ou un de ses fragments selon l'invention, capables de se lier à une séquence nucléotidique selon l'invention, ou capables de reconnaître un anticorps selon l'invention, et/ou capables de moduler, d'induire ou d'inhiber l'expression de gènes, et/ou de modifier la réplication cellulaire de circovirus MAP ou  
25 capables d'induire ou d'inhiber les pathologies liées à une infection par un circovirus MAP, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

- a) mise en contact dudit composé avec ledit polypeptide, ladite séquence nucléotidique, avec une cellule transformée selon l'invention et/ou administration dudit composé à un animal transformé selon l'invention ;
- 30 b) détermination de la capacité dudit composé à se lier avec ledit polypeptide ou ladite séquence nucléotidique, ou de moduler, d'induire ou d'inhiber l'expression de gènes, ou de moduler la croissance ou la réplication de circovirus MAP,

ou d'induire ou d'inhiber chez ledit animal transformé les pathologies liées à une infection par circovirus MAP (dénommée activité dudit composé).

Les composés susceptibles d'être sélectionnés peuvent être des composés organiques tels que des polypeptides ou hydrates de carbone ou tous autres composés organiques ou inorganiques déjà connus, ou des composés organiques nouveaux  
5 élaborés à partir de techniques de modélisation moléculaire et obtenus par synthèse chimique ou bio-chimique, ces techniques étant connues de l'homme de l'art.

Lesdits composés sélectionnés pourront être utilisés pour moduler la réplication cellulaire de circovirus MAP et ainsi pour contrôler l'infection par ce virus. Les  
10 méthodes permettant de déterminer lesdites modulations étant bien connues de l'homme de l'art.

Cette modulation peut être réalisée par exemple par un agent capable de se lier à une protéine et ainsi d'inhiber ou de potentialiser son activité biologique, ou capable de se lier à une protéine d'enveloppe de la surface externe dudit virus et de bloquer la  
15 pénétration dudit virus dans la cellule hôte ou de favoriser l'action du système immunitaire de l'organisme infecté dirigé à l'encontre dudit virus. Cette modulation peut être également réalisée par un agent capable de se lier à une séquence nucléotidique d'un ADN dudit virus et de bloquer par exemple l'expression d'un polypeptide dont l'activité biologique ou structurelle est nécessaire à la réplication ou à  
20 la prolifération dudit virus cellules hôtes à cellules hôtes dans l'animal hôte.

L'invention concerne les composés susceptibles d'être sélectionnés par une méthode de sélection selon l'invention.

L'invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant un composé choisi parmi les composés suivants :

- 25 a) une séquence nucléotidique selon l'invention ;
- b) un polypeptide selon l'invention ;
- c) un vecteur, une particule virale ou une cellule transformée selon l'invention ;
- d) un anticorps selon l'invention ;
- 30 e) un composé susceptible d'être sélectionné par une méthode de sélection selon l'invention ;

éventuellement en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable et, le cas échéant, avec un ou plusieurs adjuvants de l'immunité appropriés.

L'invention concerne aussi une composition immunogène et/ou vaccinale, caractérisée en ce qu'elle comprend un composé choisi parmi les composés suivants :

- 5 a) une séquence nucléotidique selon l'invention ;
- b) un polypeptide selon l'invention ;
- c) un vecteur ou une particule virale selon l'invention ; et
- d) une cellule selon l'invention.

L'invention concerne en outre une composition vaccinale selon l'invention, 10 caractérisée en ce qu'elle comprend un mélange d'au moins deux desdits composés a), b), c) et d) précédents et en ce que l'un des deux desdits composés est relatif au circovirus MAP de type A et l'autre relatif au circovirus MAP de type B.

Par composé relatif au circovirus MAP de type A ou de type B, on entend désigner ici respectivement un composé obtenu à partir de la séquence génomique du 15 circovirus MAP de type A ou de type B.

L'invention vise en outre une composition immunogène et/ou vaccinale, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins l'un des composés suivants :

- une séquence nucléotidique SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, ou un de leurs fragments ;
- 20 - un polypeptide de séquence SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, ou un de leurs fragments ;
- un vecteur ou une particule virale comprenant une séquence nucléotidique SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, ou un de leurs fragments ;
- une cellule transformée capable d'exprimer un polypeptide de séquences SEQ 25 ID N° 14, SEQ ID N° 15, ou un de leurs fragments ; ou
- un mélange de deux au moins desdits composés.

L'invention comprend aussi une composition immunogène et/ou vaccinale selon l'invention, caractérisée en ce qu'elle comprend ledit mélange de deux au moins desdits composés comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou 30 étalée dans le temps pour la prévention ou le traitement d'infection par un circovirus MAP, notamment de type B.

Dans un mode de réalisation préférée, la composition vaccinale selon l'invention comprend le mélange de composés suivants :

- un plasmide pcDNA3 contenant un acide nucléique de séquence SEQ ID N° 11 ;
- 5        - un plasmide pcDNA3 contenant un acide nucléique de séquence SEQ ID N° 12 ;
- un plasmide pcDNA3 contenant un acide nucléique codant pour la protéine GM-CSF ;
- un baculovirus recombinant contenant un acide nucléique de séquence SEQ ID
- 10    N° 11 ;
- un baculovirus recombinant contenant un acide nucléique de séquence SEQ ID N° 12 ; et
- le cas échéant, un adjuvant de l'immunité approprié, notamment l'adjuvant AIF™.

15        L'invention vise également une composition pharmaceutique selon l'invention, pour la prévention ou le traitement d'une infection par un circovirus MAP.

L'invention vise aussi une composition pharmaceutique selon l'invention, pour la prévention ou le traitement d'une infection par le circovirus MAP de type B.

20        L'invention concerne également l'utilisation d'une composition selon l'invention, pour la préparation d'un médicament destinée à la prévention ou le traitement d'infection par un circovirus MAP, de préférence par le circovirus MAP de type B.

25        Sous un autre aspect, l'invention a pour objet un vecteur, une particule virale ou une cellule selon l'invention, pour le traitement et/ou la prévention d'une maladie par thérapie génique.

Enfin, l'invention comprend l'utilisation d'un vecteur, d'une particule virale ou d'une cellule selon l'invention, pour la préparation d'un médicament destinée au traitement et/ou la prévention d'une maladie par thérapie génique.

30        Les polypeptides de l'invention entrant dans les compositions immunogènes ou vaccinales selon l'invention peuvent être sélectionnés par des techniques connues de l'homme de l'art comme par exemple sur la capacité desdits polypeptides à stimuler les cellules T, qui se traduit par exemple par leur prolifération ou la sécrétion

d'interleukines, et qui aboutit à la production d'anticorps dirigés contre lesdits polypeptides.

Chez le porc, comme chez la souris, chez lesquelles une dose pondérale de la composition vaccinale comparable à la dose utilisée chez l'homme est administrée, la  
5 réaction anticorps est testée par prélèvement du sérum suivi d'une étude de la formation d'un complexe entre les anticorps présents dans le sérum et l'antigène de la composition vaccinale, selon les techniques usuelles.

Les compositions pharmaceutiques selon l'invention contiendront une quantité efficace des composés de l'invention, c'est-à-dire en quantité suffisante du ou desdits  
10 composés permettant d'obtenir l'effet désiré, comme par exemple la modulation de la réplication cellulaire de circovirus MAP. L'homme de l'art saura déterminer cette quantité, en fonction par exemple de l'âge et du poids de l'individu à traiter, de l'état d'avancement de la pathologie, des effets secondaires éventuels et au moyen de test d'évaluation des effets obtenus sur un échantillonnage de population, ces tests étant  
15 connus dans ces domaines d'applications.

Selon l'invention, lesdites compositions vaccinales seront de préférence en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable et, le cas échéant, avec un ou plusieurs adjuvants de l'immunité appropriés.

Aujourd'hui, divers types de vaccins sont disponibles pour protéger l'animal ou  
20 l'homme contre des maladies infectieuses : micro-organismes vivants atténués (*M. bovis* - BCG pour la tuberculose), micro-organismes inactivés (virus de la grippe), des extraits acellulaires (*Bordetella pertussis* pour la coqueluche), protéines recombinées (antigène de surface du virus de l'hépatite B), des polysides (pneumocoques). Des vaccins préparés à partir de peptides de synthèse ou de micro-organismes  
25 génétiquement modifiés exprimant des antigènes hétérologues sont en cours d'expérimentation. Plus récemment encore, des ADNs plasmidiques recombinés portant des gènes codant pour des antigènes protecteurs ont été proposés comme stratégie vaccinale alternative. Ce type de vaccination est réalisé avec un plasmide particulier dérivant d'un plasmide de *E. coli* qui ne se réplique pas *in vivo* et qui code uniquement  
30 pour la protéine vacciante. Des animaux ont été immunisés en injectant simplement l'ADN plasmidique nu dans le muscle. Cette technique conduit à l'expression de la protéine vaccinale *in situ* et à une réponse immunitaire de type cellulaire (CTL) et de



type humoral (anticorps). Cette double induction de la réponse immunitaire est l'un des principaux avantages de la technique de vaccination avec de l'ADN nu.

Les compositions vaccinales comprenant des séquences nucléotidiques ou des vecteurs dans lesquels sont insérées lesdites séquences, sont notamment décrites dans la  
5 demande internationale N° WO 90/11092 et également dans la demande internationale N° WO 95/11307.

La séquence nucléotidique constitutive de la composition vaccinale selon l'invention peut être injectée à l'hôte après avoir été couplée à des composés qui favorisent la pénétration de ce polynucléotide à l'intérieur de la cellule ou son transport  
10 jusqu'au noyau cellulaire. Les conjugués résultants peuvent être encapsulés dans des microparticules polymères, comme décrit dans la demande internationale N° WO 94/27238 (Medisorb Technologies International).

Selon un autre mode de réalisation de la composition vaccinale selon l'invention, la séquence nucléotidique, de préférence un ADN, est complexée avec du  
15 DEAE-dextran (Pagano et al., 1967) ou avec des protéines nucléaires (Kaneda et al., 1989), avec des lipides (Felgner et al., 1987) ou encapsulée dans des liposomes (Fraley et al., 1980) ou encore introduite sous la forme d'un gel facilitant sa transfection dans les cellules (Midoux et al., 1993, Pastore et al., 1994). Le polynucléotide ou le vecteur selon l'invention peut aussi être en suspension dans une solution tampon ou être associé  
20 à des liposomes.

Avantageusement, un tel vaccin sera préparé conformément à la technique décrite par Tacson et al. ou Huygen et al. en 1996 ou encore conformément à la technique décrite par Davis et al. dans la demande internationale N° WO 95/11307.

Un tel vaccin peut être également préparé sous la forme d'une composition  
25 contenant un vecteur selon l'invention, placée sous le contrôle d'éléments de régulation permettant son expression chez l'homme ou l'animal. On pourra par exemple utiliser, en tant que vecteur d'expression *in vivo* de l'antigène polypeptidique d'intérêt, le plasmide pcDNA3 ou le plasmide pcDNA1/neo, tous les deux commercialisés par Invitrogen (R & D Systems, Abingdon, Royaume-Uni). On peut aussi utiliser le  
30 plasmide VIJns.tPA, décrit par Shiver et al. en 1995. Un tel vaccin comprendra avantageusement, outre le vecteur recombinant, une solution saline, par exemple une solution de chlorure de sodium.

On entend désigner par véhicule pharmaceutiquement acceptable, un composé ou une combinaison de composés entrant dans une composition pharmaceutique ou vaccinale ne provoquant pas de réactions secondaires et qui permet par exemple la facilitation de l'administration du composé actif, l'augmentation de sa durée de vie et/ou  
5 de son efficacité dans l'organisme, l'augmentation de sa solubilité en solution ou encore l'amélioration de sa conservation. Ces véhicules pharmaceutiquement acceptables sont bien connus et seront adaptés par l'homme de l'art en fonction de la nature et du mode d'administration du composé actif choisi.

En ce qui concerne les formulations vaccinales, celles-ci peuvent comprendre  
10 des adjuvants de l'immunité appropriés qui sont connus de l'homme de l'art, comme par exemple l'hydroxyde d'aluminium, un représentant de la famille des muramyl peptides comme un des dérivés peptidiques du N-acétyl-muramyl, un lysat bactérien, ou encore l'adjuvant incomplet de Freund.

Ces composés peuvent être administrés par voie systémique, en particulier par  
15 voie intraveineuse, par voie intramusculaire, intradermique ou sous-cutanée, ou par voie orale. De manière plus préférée, la composition vaccinale comprenant des polypeptides selon l'invention, sera administrée par voie intramusculaire, au travers de l'alimentation ou par nébulisation à plusieurs reprises, de manière étalée dans le temps.

Leurs modes d'administration, posologies et formes galéniques optimaux  
20 peuvent être déterminés selon les critères généralement pris en compte dans l'établissement d'un traitement adapté à un animal comme par exemple l'âge ou le poids, la gravité de son état général, la tolérance au traitement et les effets secondaires constatés.

La présente invention a également pour objet l'utilisation des séquences  
25 nucléotidiques de circovirus MAP selon l'invention, pour la construction de vecteurs rétroviraux autoréplicatifs et les applications thérapeutiques de celles-ci, notamment dans le domaine de la thérapie génique humaine in vivo.

La faisabilité de la thérapie génique appliquée à l'homme n'est plus à démontrer et ceci concerne de nombreuses applications thérapeutiques comme les maladies  
30 génétiques, les maladies infectieuses et les cancers. De nombreux documents de l'art antérieur décrivent les moyens de mettre en oeuvre une thérapie génique, notamment par l'intermédiaire de vecteurs viraux. D'une manière générale, les vecteurs sont

obtenus par délétion d'au moins une partie des gènes viraux qui sont remplacés par les gènes d'intérêt thérapeutique. De tels vecteurs peuvent être propagés dans une lignée de complémentation qui fournit en trans les fonctions virales délétées pour générer une particule de vecteur viral défective pour la réplication mais capable d'infecter une  
5 cellule hôte. A ce jour, les vecteurs rétroviraux sont parmi les plus utilisés et leur mode d'infection sont largement décrits dans la littérature accessible à l'homme de l'art.

Le principe de la thérapie génique est de délivrer un gène fonctionnel, dit gène d'intérêt, dont l'ARN ou la protéine correspondante produira l'effet biochimique désiré dans les cellules ou tissus ciblés. D'une part, l'insertion de gènes permet l'expression  
10 prolongée de molécules complexes et instables comme des ARNs ou des protéines qui peuvent être extrêmement difficiles voire impossibles à obtenir ou à administrer directement. D'autre part, l'insertion contrôlée du gène désiré à l'intérieur de cellules spécifiques ciblées permet de réguler le produit d'expression dans des tissus définis. Pour cela, il est nécessaire de pouvoir insérer le gène thérapeutique désiré à l'intérieur  
15 de cellules choisies et donc de disposer de méthode d'insertion capable de cibler spécifiquement les cellules ou les tissus choisis.

Parmi les méthodes d'insertion de gènes, comme par exemple la micro-injection, notamment l'injection d'ADN plasmidique nu (Derse, D. et al., 1995, et Zhao, T.M. et al., 1996), l'électroporation, la recombinaison homologue, l'utilisation de particules  
20 virales, comme les rétrovirus, est largement répandue. Cependant, appliqués in vivo, les systèmes de transfert de gène de type rétroviral recombinant présentent à la fois un faible pouvoir infectieux (concentration insuffisante de particules virales) et un manque de spécificité vis-à-vis des cellules cibles choisies.

La réalisation de vecteurs viraux cellules spécifiques, présentant un tropisme  
25 tissu-spécifique, et dont la transduction du gène d'intérêt peut être effectuée de manière adéquate par les cellules cibles, est réalisable par exemple en fusionnant un ligand spécifique des cellules hôtes cibles à la partie N-terminale d'une protéine de surface de l'enveloppe de circovirus MAP. On peut citer par exemple la construction de particules rétrovirales présentant la molécule CD4 à la surface de l'enveloppe de manière à cibler  
30 les cellules humaines infectées par le virus HIV (YOUNG, J.A.T. et al., Sciences 1990, 250, 1421-1423), de particules virales présentant une hormone peptidique fusionnée avec une protéine de l'enveloppe pour infecter spécifiquement les cellules exprimant le

récepteur correspondant (KASAHARA, N. et al., Sciences 1994, 266, 1373-1376) ou bien encore de particules virales présentant un polypeptide fusionné capable de se fixer sur le récepteur du facteur de croissance de l'épiderme (EGF)(COSSET, F.L. et al., J. of Virology 1995, 69, 10, 6314-6322). Dans une autre approche, des fragments simple  
5 chaîne d'anticorps dirigés contre des antigènes de surface des cellules cibles, sont insérés par fusion à la partie N-terminale de la protéine d'enveloppe (VALSESIA-WITTMAN, S. et al., J. of Virology 1996, 70, 3, 2059-2064 ; TEARINA CHU, T. H. et al., J. of Virology 1997, 71, 1, 720-725).

Aux fins de la présente invention, un gène d'intérêt en usage dans l'invention  
10 peut être obtenu d'un organisme eucaryote, procaryote ou d'un virus par toute technique conventionnelle. Il est, de préférence, capable de produire un produit d'expression ayant un effet thérapeutique et il peut s'agir d'un produit homologue à la cellule hôte ou, de manière alternative, hétérologue. Dans le cadre de la présente invention, un gène d'intérêt peut coder pour un produit (i) intracellulaire (ii) membranaire présent à la  
15 surface de la cellule hôte ou (iii) sécrété hors de la cellule hôte. Il peut donc comprendre des éléments additionnels appropriés comme, par exemple, une séquence codant pour un signal de sécrétion. Ces signaux sont connus de l'homme de l'art.

Conformément aux buts poursuivis par la présente invention, un gène d'intérêt peut coder pour une protéine correspondant à tout ou partie d'une protéine native telle  
20 que trouvée dans la nature. Il peut également s'agir d'une protéine chimérique, par exemple provenant de la fusion de polypeptides d'origines diverses ou d'un mutant présentant des propriétés biologiques améliorées et/ou modifiées. Un tel mutant peut être obtenu par des techniques de biologie classiques par substitution, délétion et/ou addition d'un ou plusieurs résidus acides aminés.

25 On préfère tout particulièrement mettre en oeuvre un gène d'intérêt thérapeutique codant pour un produit d'expression capable d'inhiber ou retarder l'établissement et/ou le développement d'une maladie génétique ou acquise. Un vecteur selon l'invention est particulièrement destiné à la prévention ou au traitement de la mucoviscidose, de l'hémophilie A ou B, de la myopathie de Duchenne ou de Becker, du  
30 cancer, du SIDA et d'autres bactéries ou maladies infectieuses dues à un organisme pathogène : virus, bactérie, parasite ou prion. Les gènes d'intérêt utilisables dans la présente invention, sont ceux qui codent par exemple pour les protéines suivantes :

- une cytokine et notamment une interleukine, un interféron, un facteur de nécrose tissulaire et un facteur de croissance et notamment hématopoïétique (G-CSF, GM-CSF),
- un facteur ou cofacteur impliqué dans la coagulation et notamment le facteur VIII, le facteur von Willebrand, l'antithrombine III, la protéine C, la thrombine et l'hirudine,
- une enzyme ou un inhibiteur d'enzyme tel que les inhibiteurs de protéases virales,
- un produit d'expression d'un gène suicide comme la thymidine kinase du virus HSV (virus de l'herpès) de type 1,
- un activateur ou un inhibiteur de canaux ioniques,
- une protéine dont l'absence, la modification ou la dérégulation de l'expression est responsable d'une maladie génétique, telle que la protéine CFTR, la dystrophine ou minidystrophine, l'insuline, l'ADA (adénosine diaminase), la glucocérébrosidase et la phénylhydroxylase,
- une protéine capable d'inhiber l'initiation ou la progression de cancers, telle que les produits d'expression des gènes suppresseurs de tumeurs, par exemple les gènes P53 et Rb,
- une protéine capable de stimuler une réponse immunitaire ou un anticorps, et
- une protéine capable d'inhiber une infection virale ou son développement, par exemple les épitopes antigéniques du virus en cause ou des variants altérés de protéines virales susceptibles d'entrer en compétition avec les protéines virales natives.

L'invention concerne ainsi les vecteurs caractérisés en ce qu'ils comprennent une séquence nucléotidique de circovirus MAP selon l'invention, et en ce qu'ils comprennent en outre un gène d'intérêt.

La présente invention concerne également des particules virales générées à partir dudit vecteur selon l'invention. Elle concerne de plus des méthodes pour la préparation de particules virales selon l'invention, caractérisées en ce qu'elles mettent en oeuvre un vecteur selon l'invention, incluant les pseudoparticules virales (VLP, Virus-Like Particles).

L'invention a également pour objet des cellules animales transfectées par un vecteur selon l'invention.

Sont également comprises dans l'invention les cellules animales, notamment de

mammifères, infectées par une particule virale selon l'invention.

La présente invention concerne également un vecteur, une particule virale ou une cellule selon l'invention, pour le traitement et/ou la prévention d'une maladie génétique ou d'une maladie acquise comme le cancer ou une maladie infectieuse.

- 5 L'invention s'adresse également à une composition pharmaceutique comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique un vecteur ou une cellule selon l'invention, en association avec un véhicule acceptable d'un point de vue pharmaceutique.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans les  
10 exemples et les figures suivants :

Légendes des figures :

Figure 1 : Schéma expérimental ayant permis d'aboutir à l'isolement et à l'identification du circovirus associé au MAP de type A et B.

Essai 1 : reproduction expérimentale du MAP par inoculation de broyats  
15 d'organes de porcs d'élevages atteints de MAP.

Essai 2 : reproduction expérimentale du MAP.

Essai 3 : reproduction expérimentale du MAP.

Essai 4 : pas de reproduction expérimentale du MAP.

Figure 2 : Organisation du génome du circovirus associé au MAP de type A (PCVA)

- 20 - brin de polarité (+) (SEQ ID N° 1) ;  
- brin de polarité (-) (SEQ ID N° 2, représentée suivant l'orientation 3' → 5') ;  
- séquences d'acides aminés des protéines codées par les deux brins d'ADN dans les trois cadres de lecture possibles.

Figure 3 : Alignement de la séquence nucléotidique SEQ ID N° 1 du circovirus MAP de  
25 type A (PCVA) et des circovirus souche MEEHAN et souche MANKERTZ des lignées cellulaires porcines.

Figure 4 : Alignement de la séquence d'acides aminés SEQ ID N° 6 de polypeptide codé par la séquence nucléotidique SEQ ID N° 3 (ORF1) du circovirus MAP de type A (PCVA) et des séquences nucléotidiques correspondantes des circovirus souche  
30 MEEHAN et souche MANKERTZ des lignées cellulaires porcines.

Figure 5 : Alignement de la séquence d'acides aminés SEQ ID N° 7 de polypeptide codé par la séquence nucléotidique SEQ ID N° 4 (ORF2) du circovirus MAP de type A

(PCVA) et des séquences nucléotidiques correspondantes des circovirus souche MEEHAN et souche MANKERTZ des lignées cellulaires porcines.

Figure 6 : Alignement de la séquence d'acides aminés SEQ ID N° 8 de polypeptide codé par la séquence nucléotidique SEQ ID N° 5 (ORF3) du circovirus MAP de type A (PCVA) et des séquences nucléotidiques correspondantes des circovirus souche MEEHAN et souche MANKERTZ des lignées cellulaires porcines.

Figure 7 : Analyse par Western-Blot des protéines recombinantes du circovirus MAP de type A (PCVA).

Les analyses ont été réalisées sur des extraits cellulaires de cellules Sf9 obtenus après infection par le baculovirus recombinant PCV ORF 1.

Figure 8 : Organisation du génome du circovirus associé au MAP de type B (PCVB)

- brin de polarité (+) (SEQ ID N° 9) ;
- brin de polarité (-) (SEQ ID N° 10, représentée suivant l'orientation 3'→5');
- séquences d'acides aminés des protéines codées par les deux brins d'ADN dans les trois cadres de lecture possibles.

Figure 9 : Evolution du gain moyen quotidien (GMQ) de porcs d'élevage atteints de maladie d'amaigrissement du porcelet (MAP ou DFP), placés dans les conditions expérimentales.

Figure 10 : GMQ comparée pour les 3 lots de porcs (F1, F3 et F4) calculée sur une période de 28 jours, après essai de vaccination.

Figure 11 : Hyperthermie supérieure à 41°C, exprimée en pourcentage comparée pour les 3 lots de porcs (F1, F3 et F4) calculée par semaine sur une période de 28 jours, après essai de vaccination.

Figure 12 : Membranes des spots peptides correspondant aux ORF2 révélées à l'aide d'un sérum de porc infecté, issu d'un élevage conventionnel.

Les numéros de peptides spécifiques du circovirus de type B ainsi que leurs homologues non réactifs (type A) sont indiqués en gras.

Les peptides immunogènes non spécifiques sont indiqués en italique.

Figure 13 : Alignement des séquences d'acides aminés des protéines codées par l'ORF2 du circovirus MAP de type A et par l'ORF'2 du circovirus MAP de type B. La position de 4 peptides correspondant à des épitopes spécifiques du circovirus MAP de type B est

indiquée sur la séquence correspondante en trait gras, leur homologue sur la séquence du circovirus MAP de type A est également indiqué par un trait simple.

### EXEMPLES

#### 5 EXEMPLE 1 : Clonage, séquençage et caractérisation du circovirus MAP de type A (PCVA)

##### 1 - Procédures expérimentales

Reproduction expérimentale de l'infection et de son syndrome (cf. figure 1).

Un premier essai a été effectué avec des porcs issus d'un élevage de très bonne  
10 tenue, mais atteint de la maladie de l'amaigrissement du porcelet (MAP) ou dénommée également DFP (Dépérissement Fatal du Porcelet). Des épreuves contact avec des porcs EOPS (Exempts d'organismes pathogènes spécifiés) ont montré un transfert de contaminant(s) se traduisant par une pathologie complexe associant hyperthermie, ralentissement de la croissance, diarrhée et conjonctivite. Le virus SDRP (syndrome  
15 dysgénésique et respiratoire porcin, maladie infectieuse due à un artérovirus) a été rapidement isolé à partir des porcs d'élevage et des porcs contact. L'ensemble des signes cliniques aurait pu être attribué à la présence du virus SDRP. Toutefois, deux porcs d'élevage ont présenté des signes de DFP sans que le virus SDRP soit isolé. Les analyses histologiques et formules sanguines ont cependant montré que ces porcs étaient  
20 atteints d'un processus infectieux d'origine virale.

Dans un deuxième essai, des porcs EOPS de 8 semaines ont été inoculés par voie intratrachéale avec les broyats d'organes provenant des deux porcs d'élevage atteints de DFP. Les porcs inoculés ont présenté de l'hyperthermie 8 à 9 jours post-infection, puis leur croissance a été ralentie. D'autres porcs EOPS, placés au contact, ont présenté des  
25 signes similaires, atténués, 30 jours après l'épreuve initiale. Aucune séroconversion vis-à-vis d'une souche européenne ou canadienne de virus SDRP n'a été enregistrée chez ces animaux.

Un troisième essai a permis de reproduire le syndrome à partir de prélèvements effectués sur les porcs du second essai.

##### 30 Conclusion

Le syndrome est reproduit dans les conditions expérimentales. Il est déterminé par au moins un agent infectieux, transmissible par contact direct. Les constantes



cliniques sont une hyperthermie parfois élevée (supérieure ou égale 41,5°C) qui se développe 8 à 10 jours après infection. Un ralentissement de la croissance peut être observé. Les autres manifestations sont une inversion de la formule sanguine (inversion du rapport lymphocyte/polynucléaire de 70/30 à 30/70) et des lésions fréquentes sur les ganglions, notamment ceux drainant l'appareil respiratoire (hyper-trophie ganglionnaire, perte de structure avec nécrose et infiltration par des cellules mononucléées ou plurinucléées géantes).

## 2 - Etudes en laboratoire

Divers supports cellulaires incluant des cellules de rein de porc primaires ou en lignée, des cellules de testicule de porc, des cellules de rein de singe, des lymphocytes de porc, des macrophages alvéolaires de porc, des monocytes du sang circulant, ont été utilisés pour mettre en évidence la présence éventuelle d'un virus. Aucun effet cytopathique n'a été mis en évidence sur ces cellules. En revanche, l'utilisation d'un sérum de porc malade après infection expérimentale a permis de révéler un antigène intracellulaire dans les monocytes, les macrophages et environ 10 % des cellules de rein de porc (RP) infectées avec les broyats d'organe. Cette révélation indirecte a été faite en cinétique à différents temps de culture. Il en ressort que l'antigène apparaît initialement dans le noyau des cellules infectées avant de se répandre dans le cytoplasme. Les passages successifs en culture cellulaire n'ont pas permis d'amplifier le signal.

En microscopie électronique sur des broyats d'organes, il a été visualisé des particules sphériques marquées spécifiquement par le sérum de porcs malades, infectés dans les conditions expérimentales. La taille de ces particules est estimée à 20 nm.

Après deux passages de ces broyats d'organes sur lymphocytes de porc puis trois passages sur cellules de rein ou de testicule de porc, un effet cytopathique s'est développé et a été amplifié. Au microscope électronique a été visualisé un adénovirus qui, dans les conditions expérimentales, n'a pas reproduit le DFP (on note seulement un pic d'hyperthermie 24 à 48 heures après infection, puis plus rien).

Des bandes d'ADN dans certains prélèvements de porcs infectés dans les conditions expérimentales et ayant présenté des signes de la maladie ont pu être mis en évidence (résultats non représentés). Il existe une certaine correspondance entre les prélèvements donnant un résultat positif en culture cellulaire et ceux présentant une bande d'ADN.

### Conclusion

Au moins deux types de virus ont été mis en évidence dans les broyats d'organes issus de porcs malades de DFP. L'un est un adénovirus, mais il ne reproduit pas à lui seul la maladie. L'autre type de virus est un circovirus et est associé au DFP. Ce  
5 circovirus, dont deux types ont été isolés et séquencés, dénommés ci-après circovirus MAP de type A (ou PCVA) et circovirus MAP de type B (ou PCVB) présentent des mutations par rapport aux séquences connues de circovirus non pathogènes pour le porc.

#### 3 - Clonage et séquençage de l'ADN du circovirus MAP de type A

Extraction de l'ADN forme répllicative (RF), clivage par l'enzyme Kpn I et  
10 amplification par un couple d'amorces flanquant le site de restriction Kpn I. Séquençage des deux brins au moins deux fois par la méthode de Sanger.

La séquence nucléique du brin de polarité (+) du génome du circovirus MAP de type A (ou PCVA), souche DFP, est représentée par la séquence SEQ ID N° 1 dans la liste des séquences, la séquence nucléique du brin de polarité(-) du génome du  
15 circovirus MAP de type A (ou PCVA) étant représentée par la séquence nucléique 3' → 5' de la figure 3 ou par la séquence SEQ ID N° 2 (représentée suivant l'orientation 5' → 3') dans la liste de séquences .

Les séquences d'acides aminés SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7 et SEQ ID N° 8 de la liste des séquences représentent respectivement les séquences des protéines codées  
20 par les séquences nucléiques des 3 cadres ouverts de lecture SEQ ID N° 3 (ORF1), correspondant à la protéine REP, SEQ ID N° 4 (ORF2) et SEQ ID N° 5 (ORF3), déterminées à partir de la séquence SEQ ID N° 1 du brin de polarité (+) ou de la séquence nucléique SEQ ID N°2 du brin de polarité (-) du génome du circovirus MAP de type A.

#### 25 4 - Comparaison des séquences nucléotidiques et d'acides aminés du circovirus MAP de type A (ou associé à la MAP) obtenues avec les séquences correspondantes de circovirus MEEHAN et MANKERTZ de lignées cellulaires porcines

Utilisation du logiciel d'analyse de séquence d'ADN, DNASIS.

#### 30 Séquences des oligonucléotides utilisés comme amorces ou sondes dans les procédés de détection et/ou d'identification

1. détection spécifique du circovirus MAP de type A :

amorce PCV 5 : 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3' ;

amorce PCV 10 : 5' TGG AAT GTT AAC GAG CTG AG 3' ;

2. détection spécifique du circovirus des lignées cellulaires :

amorce PCV 5 : 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3' ;

5 amorce MEE1 : 5' TGG AAT GTT AAC TAC CTC AA 3' ;

3. détection différentielle :

les couples d'amorces utilisés sont ceux par exemple décrits dans les paragraphes 1 et 2 ci-dessus ;

4. détection des formes répliquatives RF (replicative forms) circulaires  
10 monomériques :

amorce PCV 5 : 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3' ;

amorce PCV 6 : 5' CTC GCA GCC ATC TTG GAA TG 3' ;

5. détection des vecteurs portant les dimères en tandem :

dimère Nar :

15 amorce KS 620 : 5' CGC GCG TAA TAC GAC TCA CT 3' ;

amorce PCV 5 : 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3' ;

dimère Kpn :

amorce KS 620 : 5' CGC GCG TAA TAC GAC TCA CT 3' ;

amorce PCV 6 : 5' CTC GCA GCC ATC TTG GAA TG 3' ;

- 20 6. détection différentielle :

les couples d'amorces utilisés sont ceux par exemple décrits dans les paragraphes 4 et 5 ci-dessus.

Les procédés utilisant les couples d'amorces décrits dans les paragraphes 4 et 5 sont particulièrement intéressants pour détecter de façon différentielle les formes  
25 monomériques circulaires de formes répliquatives spécifiques du virion ou de l'ADN en répllication et les formes dimériques retrouvées dans les constructions moléculaires dites en tandem.

Les constructions en tandem du génome viral (dimères) telles que les constructions utilisées pour la préparation du vecteur pBS KS+ Tandem PCV Kpn I,  
30 déposé à la CNCM sous le numéro I-1891, le 3 juillet 1997 (E-coli transformée par ledit vecteur) sont très intéressantes pour leur utilisation dans des méthodes de production en quantité suffisante d'un inoculum constitué d'ADN, destiné à la production de virus et

ceci en l'absence de protocole satisfaisant de production de virus sur système cellulaire. Cesdites méthodes de production utilisant ces constructions en tandem du génome viral permettront d'étudier par mutation les facteurs de virulence et par voie de conséquence pourront être utilisées pour la fabrication d'une collection de virus portant les mutations indiquées dans la construction des vecteurs qui présenteront le tropisme et la virulence appropriés. Ces vecteurs à structure autorépliquative présentent des propriétés recherchées en transfert de gènes, notamment pour leurs applications en thérapie génique, et en vaccinologie.

#### Analyse par Western-Blot des protéines recombinantes du circovirus MAP de type A

Les résultats ont été obtenus en utilisant un antisérum spécifique du circovirus MAP produit lors de l'essai 1 (cf. figure 1).

#### Type de produits analysés

Les analyses ont été réalisées sur des extraits cellulaires de cellules Sf9 obtenus après infection par le baculovirus recombinant PCV ORF 1.

La culture des cellules Sf9 a été réalisée sur boîte de Pétri de 25 cm<sup>2</sup> selon les méthodes de culture standard pour ces cellules. Après centrifugation, les culots cellulaires sont repris par 300 µl de tampon PBS (tampon phosphate salin).

#### Electrophorèse (PAGE- SDS)

L'électrophorèse est réalisée sur les extraits cellulaires de cellules Sf9 obtenus précédemment sur 5 échantillons (cf. tableau 1 ci-dessous) dans les conditions suivantes :

% gel de polyacrylamide : 8 % ; Conditions : dénaturantes

Voltage : 80 V ; Durée : 135 mn.

Tableau 1 : Nature des échantillons soumis à l'électro- phorèse

N° puits	1	2	3	4	5
dépôts	PM Rainbow	Raoul 24 h	Raoul 48 h	Raoul 72 h	Raoul 96 h
µl échant.	10	15	15	15	15
µl Laemli 4X	0	5	5	5	5

Légendes du tableau 1 :

Laemli 4X : tampon de charge

PM Rainbow : marqueurs de poids moléculaire (35, 52, 77, 107, 160 et 250 kD)

Raoul 24 h, 48h, 72h et 96h : produits d'expression de l'ORF1 du circovirus MAP de type A.

#### Western-blot

Après électrophorèse, les bandes obtenues dans les différents puits sont transférées sur membrane de nitrocellulose pendant 1 h à 100 v dans un tampon TGM (Tris-glycine-méthanol).

Le Western-blot est réalisé dans les conditions suivantes :

1) Saturation par une solution contenant 5 % de lait écrémé ; 0,05 % Tween 20 dans un tampon TBS 1X (Tris buffer saline) pendant 30 min.

2) 1er anticorps :

10 ml d'anticorps anticircovirus MAP de type A sont ajoutés dilués au 1/100, puis le milieu réactionnel est incubé une nuit à 4°C. Trois lavages de 10 min. en TBS 1X sont effectués.

3) 2ème anticorps :

10 ml d'anticorps P164 de lapin anti-immunoglobulines de porc, couplés à la peroxydase (Dakopath) sont ajoutés dilués au 1/100, puis le milieu réactionnel est incubé 3 heures à 37°C. Trois lavages de 10 min. en TBS 1X sont effectués.

4) Révélation

Le substrat 4-Chloro-1-Naphtol, en présence d'eau oxygénée est utilisé pour la révélation.

#### Résultats

Les résultats sont représentés à la figure 7.

#### Cinétique d'apparition des anticorps spécifiques de la protéine recombinante REP du circovirus MAP de type A exprimé en baculovirus après infection des porcs par le circovirus MAP de type A (essai 4, cf. figure 1)

Après infection des porcs, un échantillon de sérum de chacun des porcs infectés est prélevé à différentes périodes exprimées dans le tableau par la date du prélèvement (effectué ici la même année) puis est analysée par Western-blot.

La révélation des anticorps spécifiques est réalisée de la manière décrite précédemment.

Les résultats obtenus sont représentés par le tableau 2 ci-dessous.

5 **Tableau 2 :** Cinétique d'apparition des anticorps spécifiques

Echan.	Porcs	10/06	16/06	23/06	01/07	08/07	15/07	21/07
A3	1						Nég.	
Témoin-	2						Nég.	
B2	1	Nég.	Nég.	Nég.	+	+	++	+++
Infec.	2	Nég.	Nég.	Nég.	Nég.	Nég.	Nég.	Nég.
RP+	3	Nég.	Nég.	Nég.	Nég.	+	+	+
	4	Nég.	Nég.	Nég.	Nég.	Nég.	Nég.	++

Légendes du tableau 2 :

A3 Témoin : animaux témoins non infectés ;

10 B2 Infec. RP+ : animaux infectés avec des cellules de rein de porcs (RP) contenant le circovirus ;

Nég. : négatif ;

+, ++, +++ : échelle d'intensité de la réaction positive ;

10/06, 16/06, 23/06, 01/07, 08/07, 15/07, 21/07 : dates exprimées en jour/mois

15 auxquelles ont été effectuées les différents prélèvements de sérum.

**EXEMPLE 2 :** Clonage, séquençage et caractérisation du circovirus MAP type B (PCVB)

Les techniques utilisées pour le clonage, le séquençage et la caractérisation du circovirus MAP type B (PCVB) sont celles utilisées à l'exemple 1 ci-dessus pour le circovirus MAP type A (PCVA).

20 La séquence nucléique du brin de polarité (+) du génome du circovirus MAP de type B (ou PCVB) est représentée par la séquence SEQ ID N° 9 dans la liste des séquences, la séquence nucléique du brin de polarité (-) du génome du circovirus MAP

de type B (ou PCVB) étant représentée par la séquence nucléique 3' → 5' de la figure 8. ou par la séquence SEQ ID N° 10 (représentée suivant l'orientation 5' → 3') dans la liste de séquences.

Les séquences d'acides aminés SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15 et SEQ ID N° 16 de la liste des séquences représentent respectivement les séquences des protéines codées par les séquences nucléiques des 3 cadres ouverts de lecture SEQ ID N° 11 (ORF'1), correspondant à la protéine REP, SEQ ID N° 12 (ORF'2) et SEQ ID N° 13 (ORF'3), déterminées à partir de la séquence SEQ ID N° 9 du brin de polarité (+) ou de la séquence nucléique SEQ ID N° 10 du brin de polarité (-) du génome du circovirus MAP de type B.

**EXEMPLE 3 :** Analyse comparative des séquences nucléotidiques (ORF1, ORF2 et génomique) et des séquences d'acides aminés codés par l'ORF1 et l'ORF2 des circovirus MAP de type A (PCVA) et de type B (PCVB)

Les résultats exprimés en % d'homologie sont représentés dans les tableaux 3 et 4 ci-après.

**Tableau 3 :** Analyse comparée des séquences d'acides aminés

% homologie	ORF1	ORF2
PCVA / PCVB	80,4	56,2

**Tableau 4 :** Analyse comparée des séquences nucléotidiques

% homologie	Génomique	ORF1	ORF2	Le reste
PCVA / PCVB	70,4	80,4	60,1	66,1

**EXEMPLE 4 :** Observation de la maladie et reproduction de la maladie dans les conditions expérimentales

a) Essai N° 1 : Observation de la maladie

L'objectif est de prendre des animaux d'élevage en début de maladie et de les placer dans les conditions expérimentales pour suivre l'évolution de la pathologie et en décrire toutes les manifestations cliniques. Ce premier essai a été effectué sur 3 porcs d'élevage âgés de 10 semaines dont 2 étaient déjà malades (atteints de dépérissement), et sur 3 autres porcs âgés de 13 semaines, ne présentant pas de signes de maladie. L'observation clinique s'est étalée sur une période de 37 jours. Deux porcs de 10 semaines ont rapidement dépéri (porc 1 et 2, figure 9) et ont dû être euthanasiés 5 et 6 jours après leur arrivée. Un seul a présenté de l'hyperthermie sur 5 jours et de la diarrhée. Deux autres porcs ont présenté de la dyspnée et de la toux dont un a fait en outre de l'hyperthermie, supérieure à 41°C, les deux premiers jours de son séjour. Un autre porc a eu une croissance ralentie à la deuxième semaine (porc 6, figure 9), sans qu'aucun autre signe clinique ne soit relevé. Sur le plan lésionnel, 5 porcs sur 6 ont présenté des lésions macroscopiques de pneumonie grise, le sixième présentait des lésions cicatricielles sur le poumon.

b) Essai N° 2 : Reproduction de la maladie à partir d'inoculums préparés sur porcs d'élevage.

Les deux porcs malades dans l'essai 1 ont servi à préparer des inocula que l'on a testé dans l'essai 2 sur des porcs exempts d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS, SPF en version anglo-saxonne). Les porcs EOPS étaient âgés de 9 semaines au moment de l'inoculation. Les résultats cliniques et lésionnels sont présentés dans le tableau 5.



**Tableau 5 :** récapitulatif des mesures effectuées lors des reproductions expérimentales de la MAP. (entre parenthèses sont reportées les valeurs des animaux témoins, les valeurs soulignées indiquent une différence entre animaux infectés et animaux témoins)

Mesure	2	3	4	5	6	7
Statut des porcs	EOPS CNEVA	EOPS terrain	EOPS CNEVA	EOPS CNEVA	Conventionnels	Conventionnels
Age	9 semaines	6 semaines	5 semaines	5 semaines	5 semaines	6-7 semaines
Nombre	4	6	12	8	8	8
Voie d'inoculation	Voie intratrachéale	Voie intratrachéale	Voie intratrachéale + intramusculaire	Voie intratrachéale + intramusculaire	Voie intratrachéale + intramusculaire	Voie intratrachéale + intramusculaire
Titre inoculum par porc	ND *	ND*	10 <sup>4.53</sup> TCID <sub>50</sub> par ml: 1 ml IM + 5 ml IT	10 <sup>4.53</sup> TCID <sub>50</sub> par ml: 1 ml IM + 5 ml IT	10 <sup>4.53</sup> TCID <sub>50</sub> par ml: 1 ml IM + 5 ml IT	10 <sup>4.53</sup> TCID <sub>50</sub> par ml: 1 ml IM + 5 ml IT
Début des hyperthermies	10 jours post-infection	9-13 jours post-infection	12-13 jours post- infection	9-14 jours post- infection	8-12 jours post-infection	12 jours post-infection
% de porcs en hyperthermie **	100 %	83 %	92 %	100 %	75 %	88 %
Nb de jours d'hyperthermie par porc **	7	4,5	3,3	5,8	7,5	11,6

Températures maximales ***	40,4 à 41,7 °C	40,6 à 42,3 °C	40,2 à 41,6 °C	40,3 à 40,8 °C	40,6 à 42 °C	40,2 à 41,9 °C
Hyperthermie **** % par semaine						
S1	3,5 (3,5)	17 (36)	7 (5)	37 (17)	16 (17)	20 (28)
S2	<u>42 (3,5)</u>	7 (13)	<u>13 (11)</u>	<u>21 (3)</u>	<u>52 (10)</u>	37 (28)
S3	<u>35 (3,5)</u>	<u>33 (10)</u>	<u>28 (7)</u>	<u>62 (2)</u>	<u>34 (12)</u>	<u>79 (17)</u>
S4	<u>21 (3,5)</u>	<u>28 (7)</u>	5 (0)	6 (3)	25 (22)	<u>55 (31)</u>
GMQ :						
S1	928 (1053)	417 (357)	564 (620)	650 (589)	401 (407)	509 (512)
S2	<u>678 (1028)</u>	<u>428 (617)</u>	<u>503 (718)</u>	612 (584)	<u>294 (514)</u>	410 (310)
S3	<u>661 (1000)</u>	771 (642)	<u>381 (657)</u>	<u>520 (851)</u>	<u>375 (586)</u>	435 (440)
S4	<u>786 (1100)</u>	<u>550 (657)</u>	764 (778)	641 (696)	<u>473 (610)</u>	<u>451 (681)</u>
Transmission porcs contacts	Oui à 100 %	Oui à 75 %	Non testé	Non testé	Non testé	Non testé
% lésions pulmonaires	25	75	0	25	25	12
% lésions ganglionnaires	17	33	67	25	50	12

\* ND : non déterminé.

\*\* hyperthermie lorsque la température est supérieure à 40°C.

\*\*\* éventail des températures maximales relevées au niveau individuel.

\*\*\*\* le pourcentage correspond au nombre de relevés de température supérieure à 40°C divisé par le nombre total de relevés de température dans la semaine sur l'ensemble des porcs.

Dans cet essai, il n'y a pas eu dépérissement, tout au plus un ralentissement de la croissance à la deuxième, troisième ou quatrième semaine après infection. Ces données illustrent que certaines conditions d'élevage favorisent probablement l'expression de la maladie.

5 c) Essais N° 3 à N° 7 : Reproduction des essais expérimentaux

La multiplication des essais expérimentaux sur porcs a eu pour objectif de maîtriser et de mieux caractériser le modèle expérimental. L'ensemble des résultats est présenté dans le tableau 5.

10 Dans les conditions expérimentales, la MAP se caractérise ainsi par une incubation longue, de 8 à 14 jours, des hyperthermies franches sur 2 à 8 jours, une diminution de la consommation alimentaire et un ralentissement de la croissance pondérale à la deuxième, troisième ou quatrième semaine post-infection. Le tableau lésionnel associé à cette expression clinique comprend pour l'essentiel, des hypertrophies ganglionnaires et des lésions de pneumonie.

15 Conclusion

La mise au point de ce modèle expérimental permet de mettre en évidence de manière indiscutable le rôle étiologique direct du circovirus MAP dans la maladie. De plus, ce modèle est l'outil indispensable pour la compréhension des mécanismes pathogéniques et l'étude de futurs candidats vaccins.

20 EXEMPLE 5 : Mise en évidence de l'efficacité protectrice de composition vaccinale réalisée à partir de fragments nucléiques de séquence de circovirus MAP

1) Animaux utilisés pour l'étude

25 Des porcelets présentant la maladie MAP, reproduite dans les conditions expérimentales décrite au paragraphe c) de l'Exemple 4, ont été utilisés dans un protocole d'évaluation de l'efficacité de composition vaccinale comprenant des fragments nucléiques de séquence de circovirus MAP.

2) Composition vaccinale testée et protocole de vaccination

a) Composants utilisés pour l'étude

30 Les plasmides ont été obtenus à partir du plasmide pcDNA3 de INVITROGENE  
- Plasmides pcDNA3 ORF-

Ces plasmides sont des plasmides ne portant pas d'insert d'acide nucléique de circovirus MAP et sont utilisés à titre de plasmide témoin négatif.

- Plasmide pcDNA3ORF1+ et plasmide pcDNA3ORF2+

Les plasmides pcDNA3ORF1+ et pcDNA3ORF2+ sont des plasmides qui  
5 portent un insert d'acide nucléique de la séquence du circovirus MAP de TYPE B, respectivement un insert comprenant le fragment d'acide nucléique SEQ ID N° 11 (ORF'1) codant pour la protéine Rep de séquence SEQ ID N° 14 et un insert comprenant le fragment d'acide nucléique SEQ ID N° 12 (ORF'2) codant pour la  
10 protéine de séquence SEQ ID N° 15, correspondant probablement à la protéine de capsid, ces constructions nucléiques comprenant le codon ATG d'initiation de la séquence codante de la protéine correspondante.

- Plasmide GMCSF+

Le GM-CSF (Granulocyte/macrophage-colony stimulating factor) est une cytokine qui intervient dans le développement, la maturation et l'activation des  
15 macrophages, des granulocytes et des cellules dendritiques présentatrices d'antigène. L'apport bénéfique du GM-CSF dans la vaccination est estimé être une activation cellulaire avec notamment le recrutement et la différenciation de cellules présentatrices d'antigène.

Ce plasmide pcDNA3-GMCSF+ porte un insert d'acide nucléique codant pour le  
20 facteur de stimulation de colonies granulocytes/macrophage, la protéine GM-CSF.

Le gène codant pour cette protéine GM-CSF a été cloné et séquencé par Inumaru et al. (Immunol. Cell Biol., 1995, 73 (5), 474-476). Le plasmide pcDNA3-GMCSF+ a été obtenu auprès du Dr. B. Charley de L'INRA de Jouy-en-Josas (78, France).

- Baculovirus recombinants

25 Les baculovirus dits ORF- sont des virus ne portant pas d'insert comprenant un fragment d'acide nucléique capable d'exprimer une protéine de circovirus MAP.

Les baculovirus dits ORF1+ (BAC ORF1+) ou ORF2+ (BAC ORF2+) sont des baculovirus recombinants portant respectivement un insert comprenant un fragment d'acide nucléique SEQ ID N° 11 (ORF'1) et un insert comprenant le fragment d'acide  
30 nucléique SEQ ID N° 12 (ORF'2).

- Adjuvant

L'adjuvant fourni par la Société Seppic filiale de AIR LIQUIDE est l'adjuvant correspondant à la référence AIF SEPPIC.

b) Protocole de vaccination

5 Des porcelets sevrés âgés de 3 semaines sont répartis en quatre lots A, B, C et D comprenant chacun 8 porcelets.

Les lots A, B et C, âgés de 3 semaines, reçoivent chacun une première injection (injection M1) de 1 ml contenant 200 microgrammes de plasmides (ADN nu) en PBS, pH : 7,2, par voie intramusculaire pour chacun des plasmides mentionnés ci-après pour  
10 chaque lot, puis, à l'âge de 5 semaines une deuxième injection (injection M2) comprenant ces mêmes plasmides. Une troisième injection est pratiquée simultanément de l'autre côté du cou. Cette troisième injection comprend 1 ml d'une suspension contenant  $5.10^6$  cellules infectées par baculovirus recombinants et 1 ml d'adjuvant AIF SEPPIC.

15 Lot A (F1) (Lot témoin) :

- première injection

Plasmide pcDNA3ORF1-, plasmide pcDNA3ORF2- et plasmide GMCSF+.

- deuxième et troisième injection (simultanées)

Plasmide pcDNA3ORF1-, plasmide pcDNA3ORF2- et plasmide GMCSF+;

20 Cellules transformées par baculovirus ne contenant pas d'insert d'acide nucléique codant pour une protéine de circovirus MAP ;

Adjuvant AIF SEPPIC.

Lot B (F2) (Lot témoin) :

- première injection

25 Plasmide pcDNA3ORF1-, plasmide pcDNA3ORF2- et plasmide GMCSF+ ;

- deuxième et troisième injection (simultanées)

Plasmide pcDNA3ORF1-, plasmide pcDNA3ORF2- et plasmide GMCSF+ ;

Cellules transformées par baculovirus ne contenant pas d'insert d'acide nucléique codant pour une protéine de circovirus MAP ;

30 Adjuvant AIF SEPPIC.

Lot C (F3) :

- première injection

Plasmide pcDNA3ORF1+, plasmide pcDNA3ORF2+ et plasmide GMCSF+ ;

- deuxième et troisième injection (simultanées)

Plasmide pcDNA3ORF1+, plasmide pcDNA3ORF2+ et plasmide GMCSF+ ;

Cellules transformées par des baculovirus recombinants BAC ORF1+ et BAC  
 5 ORF2+ capables d'exprimer respectivement la protéine Rep de séquence SEQ ID N° 14  
 et la protéine de séquence SEQ ID N° 15 du circovirus MAP de TYPE B.

Lot D (F4) (lot témoin) : aucune injection

Les lots de porcelets B, C et D sont infectés (mis à l'épreuve) à l'âge de 6  
 semaines alors que le lot A n'est pas soumis à l'épreuve.

10 3) Suivi des lots

- comptage toux-éternuement : 15 minutes / lot / jour ;

- consistance matières fécales : tous les jours ;

- enregistrements habituels : Prise de sang hebdomadaire, pesées ;

- pesées des refus alimentaires : 3 fois par semaine ;

15 - calcul du gain moyen quotidien en poids (gmq) ;

Les gains moyens quotidiens ont été calculés pour chacun des lots sur une  
 période de 28 jours suivant la mise à l'épreuve (cf. figure 10), un calcul intermédiaire  
 du gmq a été également effectué pour chacun des lots sur la première et la seconde  
 période de 14 jours. Les résultats obtenus sont reportés ci-après dans le tableau 6.

20 Tableau 6 : Gains moyens quotidiens

	F1	F2	F3	F4
j0-j14	411 g	450 g	511 g	461 g
j14-j28	623 g	362 g	601 g	443 g
j0-j28	554 g	406 g	556 g	452 g

- Mesure de l'hyperthermie

La mesure de l'hyperthermie, supérieure à 41°C (cf. figure 11) et supérieure à  
 25 40,2°C, a été effectuée pour chacun des lots sur une période totale de 28 jours suivant la

mise à l'épreuve. Les résultats obtenus, correspondant au rapport exprimé en pourcentage entre le nombre de relevés thermiques supérieurs à 41°C (ou supérieurs à 40,2°C) et entre le nombre total de relevés thermiques effectués sur l'ensemble des pores par période d'une semaine, sont reportés ci-après dans les tableaux 7 et 8, respectivement pour les mesures d'hyperthermie supérieure à 41°C et supérieure à 40,2°C.

Tableau 7 : Hyperthermies > 41°C

	F1	F2	F3	F4
S1	4.1	0.	0.	0.
S2	10.7	16.	0.	8.9
S3	4.7	27.	0.	45.
S4	0.	0.	0.	7.5

10

Tableau 8 : Hyperthermies > 40.2

	F1	F2	F3	F4
S1	29.1	10.41	29.1	20.8
S2	28.5	39.2	10.7	37.5
S3	14.3	68.7	25.0	81.2
S4	3.3	17.5	20.0	55

#### 4) Conclusion

Les enregistrements effectués montrent clairement que les animaux qui ont reçu les trois injections d'une composition vaccinale comprenant des fragments d'acide nucléique de circovirus MAP selon l'invention et /ou capables d'exprimer des protéines recombinantes de circovirus MAP, en particulier de type B, n'ont pas présenté d'hyperthermie (cf. figure 10). Ces animaux n'ont pas connu en outre de baisse de leur croissance, les gmq étant comparables à ceux des animaux témoins non infectés (cf. figure 9). Ils n'ont présenté aucun signe clinique particulier.

Ces résultats mettent en évidence la protection efficace des porcelets contre l'infection par un circovirus MAP de l'invention, agent primaire responsable de la MAP ou DFP, apportée par une composition vaccinale préparée à partir de fragment d'acide nucléique de la séquence nucléique de circovirus MAP selon l'invention, en particulier de type B, et/ou à partir de protéines recombinantes codées par ces fragments d'acides nucléiques.

Ces résultats montrent en particulier que les protéines codées par les ORF1 et ORF2 de circovirus MAP selon l'invention sont des protéines immunogènes induisant une réponse protectrice efficace pour la prévention de l'infection par un circovirus MAP.

**EXEMPLE 6 :** Diagnostic sérologique de Circovirus MAP par immunodosage utilisant des protéines recombinantes ou peptides de synthèse de Circovirus MAP

##### A - Diagnostic Sérologique par protéines recombinantes

L'identification et le séquençage de circovirus porcin MAP permettent de produire par les techniques de recombinaison génétique bien connues de l'homme des protéines recombinantes de circovirus MAP.

Par ces techniques, des protéines recombinantes codées en particulier par l'ORF'2 du circovirus MAP, type B, ont été exprimées par des cellules d'insecte Sf9 transformées puis isolées.

Ces protéines recombinantes codées par l'ORF'2 sont extraites, après culture des cellules sf9 transformées, par lyse cellulaire thermique grâce à 3 cycles de surgélation/décongélation -70°C/+37°C. Des cellules Sf9 saines ou Sf9 témoins non transformées sont également lysées.



Ces deux fractions antigéniques issues de cellules Sf9 témoins non transformées et de cellules Sf9 exprimant l'ORF'2 sont précipitées à 4°C par une solution à 60 % plus ou moins 5 % de sulfate d'ammonium saturé. Un dosage de protéines totales est réalisé à l'aide du kit Biorad. 500ng de protéines Sf9 témoin et de protéines Sf9  
5 exprimant l'ORF'2 semi-purifiées, en solution dans du tampon bicarbonate 0,05 M pH 9,6 sont adsorbées passivement au fond de 3 cupules différentes d'une microplaque Nunc Maxisorp par incubation une nuit à +4°C.

La réactivité de sérums de porcs vis-à-vis de chacune de ces fractions antigéniques est évaluée par une réaction ELISA indirecte dont le protocole  
10 expérimental est détaillé ci-dessous :

- Etape de saturation : 200 µl/cupule de PBS1X/Lait demi-écrémé 3 %, incubation 1 h 30 à 37°C.
- Lavage : 200 µl/cupule de PBS1X/Tween 20 : 0,05 %, 3 lavages rapides.
- Etape d'incubation des sérums : 100 µl/cupule de sérum dilué au 1/100 en PBS1X/Lait  
15 demi-écrémé, 1 %/Tween 20 : 0,05 %, incubation 1 h à 37°C.
- Lavage : 200 µl/cupule de PBS1X/Tween 20 : 0,05 %, 2 lavages rapides suivis de 2 lavages de 5 min.
- Etape d'incubation du conjugué : 50 µl/cupule de conjugué lapin anti-porc dilué au 1/1000 en PBS1X/Lait demi-écrémé, 1 %/Tween 20 : 0,05 %, incubation 1 h à 37°C.
- 20 - Lavage : 200 µl/cupule de PBS1X/Tween 20 : 0,05 %, 2 lavages rapides suivis de 2 lavages de 5 min.
- Etape de Révélation : 100 µl/cupule de substrat OPD / Tampon Citrate / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, incubation 15 min à 37°C.
- Arrêt de Réaction : 50 µl/cupule H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N.
- 25 - Lecture au spectrophotomètre à 490 nm.

### Résultats

Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous dans le tableau 9.

Tableau 9 :

Antigènes	Réactivité Sérum Porc non inoculé par le Circovirus	Réactivité Sérum Porc inoculé par le Circovirus
Sf9 témoin purifié	0,076	0,088
Sf9 exprimant ORF'2 purifié	0,071	1,035

Les résultats sont exprimés en densité optique mesurée au spectrophotomètre à 490 nm  
 5 lors de l'analyse par ELISA de la réactivité de sérums de porc inoculé ou non par le  
 circovirus MAP type B selon le protocole indiqué ci-dessus.

#### B - Diagnostic Sérologique par Peptide de Synthèse

La cartographie épitopique des protéines codées par exemple par les séquences  
 nucléiques ORF1 et ORF2 des deux types de circovirus MAP (types A et B) a permis en  
 10 autre d'identifier des épitopes circoviraux immunogènes sur les protéines codées par les  
 séquences nucléiques ORF'1 et ORF'2 ainsi que les épitopes spécifiques de la protéine  
 codée par la séquence nucléique ORF'2 du circovirus MAP type B. Quatre épitopes  
 spécifiques du circovirus MAP type B et un épitope commun aux deux types de  
 circovirus MAP situés sur la protéines codée par la séquence nucléique ORF'2 ont été  
 15 synthétisés sous forme de peptide. Les peptides équivalents chez le circovirus de type A  
 ont également été synthétisés. Tous ces peptides ont été évalués comme antigènes de  
 diagnostic dans le cadre de la réalisation d'un test sérologique.

#### Résultats

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 10 ci-après.

Tableau 10 : Résultats de l'évaluation comme antigène de diagnostic de peptides synthétiques codés par les séquences nucléiques ORF2 et ORF'2 de circovirus MAP de type A et B.

Peptide Circovirus MAP		Position	Séquence AA	EOPS J0/J54	Réactivité Sérum Porc Infecté		Spécificité Epitopique
					Conventionnel 1 J0/J42	Conventionnel 2 J0/J42	
121	B	71-85	VDMMRFNINDFLPPG	+/-, +++	+/-, +++	- , +++	Circovirus B
177	A	70-84	NVNELRFNIGQFLPP	+/-, +	+/-, +/-	+/-, -	
132	B	115-129	QGDRGVGSSAVILDD	+/-, +/-	++ , ++	+/-, +	Circovirus B
188	A	114-127	TSNQRGVGSTVVIL	+/-, -	- , +/-	+/-, +/-	
133	B	119-134	GVGSSAVILDDNVFTK	- , ++	++ , +++	+/-, ++	
189	A	118-132	RGVGSTVVILDANFV	+/-, -	- , +/-	+/-, +/-	
146	B	171-185	FTIDYFQPNKRNQL	- , +/-	- , ++	- , ++	Circovirus A & B
202	A	170-184	DQTIDWFQPNKRNQ	+++ , +++	+/-, ++	+ , ++	
152	B	195-209	VDHVGLGTAFENSIY	- , ++	+++ , +++	+/-, +	Circovirus B
208	A	194-208	NVEHTGLGYALQNAT	- , -	- , -	- , -	

+/-, +, ++, +++. Intensités croissantes des réactivités observées en Spot-peptides sur membrane de nitrocellulose. Les sérums porcins testés sont issus d'animaux expérimentalement infectés par le circovirus de type B au sein des animaleries du CNEVA. Les animaux sont prélevés avant inoculation à J0 et 42 jours ou 54 jours après inoculation J42, J54.

**EXEMPLE 7 :** Caractérisation des épitopes spécifiques du circovirus MAP de type B

Les protéines codées par l'ORF2 des circovirus porcins de type A et B ont été choisies pour cette étude. Pour chacune des ORF2 (types A et B), 56 peptides de 15 acides aminés qui se chevauchent tous les 4 acides aminés ont été synthétisés, recouvrant ainsi la totalité de la protéine (cf. tableau 11 ci-après).

**Tableau 11 :** Séquence d'acides aminés des 56 peptides de 15 acides aminés synthétisés à partir de la séquence nucléique ORF'2 (type B) et ORF2 (type A) de circovirus MAP avec leur numéro de spot correspondant (cf. figure 12)

ORF'2 type B		ORF2 type A	
Spot n°	Séquence	Spot n°	Séquence
104	MTYPRRRYRRRRHRP	160	MTWPRRRYRRRRTRP
105	RRRYRRRRHRPRSHL	161	RRRYRRRRTRPRSHL
106	RRRRHRPRSHLGQIL	162	RRRRTPRSHLGNIL
107	HRPRSHLGQILRRRP	163	TRPRSHLGNILRRRP
108	SHLGQILRRRPWL VH	164	SHLGNILRRRPYL VH
109	QILRRRPWL VHPRHR	165	NILRRRPYL VHPAFR
110	RRPWL VHPRHRYRWR	166	RRPYLVHPAFRNRYR
111	LVHPRHRYRWRRKNG	167	LVHPAFRNRYRWRRK
112	RHRYRWRRKNGIFNT	168	AFRNRYRWRRKTGIF
113	RWRRKNGIFNTRL SR	169	RYRWRRKTGIFNSRL
114	KNGIFNTRLSRTFGY	170	RRKTGIFNSRLSREF
115	FNTRLSRTFGYTVKR	171	GIFNSRLSREFVLT I
116	LSRTFGYTVKR TTVR	172	SRLSREFVLTIRGGH
117	FGYTVKR TTVRTPSW	173	REFVLTIRGGHSQPS
118	VKR TTVRTPSWAVDM	174	LTIRGGHSQPSWNVN
119	TVRTPSWAVDMMRFN	175	GGHSQPSWNVNELRF
120	PSWAVDMMRFNINDF	176	QPSWNVNELRFNIGQ
121	VDMMRFNINDFLPPG	177	NVNELRFNIGQFLPP
122	RFNINDFLPPGGGSN	178	LRFNIGQFLPPSGGT
123	NDFLPPGGGSNPRSV	179	IGQFLPPSGGTNPLP
124	PPGGGSNPRSVPF EY	180	LPPSGGTNPLPLPFQ
125	GSNPRSVPF EYYRIR	181	GGTNPLPLPFQYYRI
126	RSVPF EYYRIRKVKV	182	PLPLPFQYYRIRKAK
127	FEYYRIRKVKVEFWP	183	PFQYYRIRKAKYEFY
128	RIRKVKVEFWPCSPI	184	YRIRKAKYEFYPRDP
129	VKVEFWPCSPITQGD	185	KAKYEFYPRDPITSN
130	FWPCSPITQD RGVG	186	EFYPRDPITSNQ RGV
131	SPITQD RGVGSSAV	187	RD PITSNQ RGVGSTV
132	QGDRGVGSSAVILDD	188	TSNQ RGVGSTV VILD

133	GVGSSAVILDDNFVT	189	RGVGSTVVILDANFV
134	SAVILDDNFVTKATA	190	STVVILDANFVTPST
135	LDDNFVTKATALTYD	191	ILDANFVTPSTNLAY
136	FVTKATALTYDPYVN	192	NFVTPSTNLAYDPYI
137	ATALTYDPYVNYSSR	193	PSTNLAYDPYINYSS
138	TYDPYVNYSSRHTIT	194	LAYDPYINYSSRHTI
139	YVNYSSRHTITQPFS	195	PYINYSSRHTIRQPF
140	SSRHTITQPFYSYHSR	196	YSSRHTIRQPFYHS
141	TITQPFYSYHSRYFTP	197	HTIRQPFYHSRYFT
142	PFSYHSRYFTP KPVL	198	QPFYHSRYFTP KPPE
143	HSRYFTP KPVL DFTI	199	YHSRYFTP KPPELDQT
144	FTP KPVL DFTIDYFQ	200	YFTP KPPELDQTIDWF
145	PVL DFTIDYFQ PNNK	201	KPELDQTIDWFQ PNN
146	FTIDYFQ PNNKRNQL	202	DQTIDWFQ PNNKRNQ
147	YFQ PNNKRNQLWLRL	203	DWFQ PNNKRNQLWLH
148	NNKRNQLWLRLQTAG	204	PNNKRNQLWLHLNTH
149	NQLWLRLQTAGNV DH	205	RNQLWLHLNTHTNVE
150	LRLQTAGNV DHVGLG	206	WLHLNTHTNVEHTGL
151	TAGNV DHVGLGTAFE	207	NHTNVEHTGLGYAL
152	VDHVGLGTAFENSIY	208	NVEHTGLGYALQNAT
153	GLGTAFENSIYDQEY	209	TGLGYALQNATTAQN
154	AFENSIYDQEYNIRV	210	YALQNATTAQNYVVR
155	SIYDQEYNIRVTMYV	211	NATTAQNYVVR LTIY
156	QEYNIRVTMYVQFRE	212	AQNYVVR LTIYVQFR
157	IRVTMYVQFRE FNFK	213	VVR LTIYVQFRE FIL
158	MYVQFRE FNFKDPPL	214	TIYVQFRE FILKDPL
159	VQFRE FNFKDPPLNP	215	YVQFRE FILKDPLNE

Ces peptides ont été synthétisés selon la méthode «spot» qui consiste en une synthèse simultanée d'un grand nombre de peptides sur un support solide de cellulose, chaque lieu de synthèse d'un peptide constituant un spot (Synt:em, NIMES). Cette méthode implique une orientation des peptides sur la plaque, ceux-ci étant fixés de façon covalente par l'extrémité carboxy-terminale. Un spot représente environ 50 nmole de peptide.

La référence des spots et des séquences peptidiques correspondantes est donnée dans le tableau 11.

Ces membranes ont été utilisées pour des tests d'immunoréactivité vis-à-vis de sérum de porcs EOPS infectés ou non expérimentalement par la souche circovirale MAP type B ainsi que vis-à-vis de sérums de porcs infectés, issus d'élevages conventionnels (élevages conventionnels 1 ou 2). Cette étude a permis de mettre en évidence des peptides immunoréactifs spécifiques du circovirus de type B correspondant aux spots N° 121, N° 132, N° 133 et N° 152 (respectivement de

séquences d'acides aminés SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19 et SEQ ID N° 20). Une illustration est présentée dans la figure 12 où les membranes sont révélées avec un sérum de porc infecté, provenant d'un élevage conventionnel. Des peptides immunoréactifs non spécifiques de type ont également été mis en évidence parmi  
5. lesquels nous retiendrons le peptide N° 146 qui est fortement immunogène.

Une comparaison entre les séquences peptidiques des circovirus de type A et B (figure 13) indique une divergence allant de 20 à 60 % pour les peptides immunoréactifs spécifiques du type B, et une divergence plus faible (13 %) entre les peptides non spécifiques.

Références bibliographiques

- Allan, G. M. et al., 1995, Vet. Microbiol., 44 : 49-64.
- Barany, F., 1911, PNAS. USA, 88 : 189-193.
- Boulton, L.H. et al., 1997, J. Gen. Virol., 78 (Pt 6), 1265-1270.
- 5 Buckholz, R.G., 1993, Yeast systems for the expression of heterologous gene products. Curr. Op. Biotechnology 4 : 538-542.
- Burg, J.L. et al., 1996, Mol. and Cell. Probes, 10 : 257-271.
- Chu, B.C.F. et al., 1986, NAR, 14 : 5591-5603.
- Chu, P.W.G. et al., 1993, Virus Research, 27 : 161-171.
- 10 Clark, E.G., 1997, American Association of Swine Practitioners, 499-501.
- Daft, B. et al., 1996, American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, 32.
- Derse, D. et al., 1995, J. Virol., 69(3) : 1907-1912.
- Duck, P. et al., 1990, Biotechniques, 9 : 142-147.
- 15 Dulac, G.C. et al., 1989, Can. J. Vet. Res., 53 : 431-433.
- Edwards, C.P., and Aruffo, A., 1993, Current applications of COS cell based transient expression systems. Curr. Op. Biotechnology 4 : 558-563.
- Edwards, S. et al., 1994, Vet. Rec., 134 : 680-681.
- Erlich, H.A., 1989, In PCR Technology. Principles and Applications for DNA
- 20 Amplification. New York : Stockton Press.
- Felgner, et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci., 84 : 7413.
- Fontes, E.P.B. et al., 1994, J. Biol. Chem., Vol. 269, N° 11 : 8459-8465.
- Fraley et al., 1980, J. Biol. Chem., 255 : 10431.
- Guateli, J.C. et al., 1990, PNAS. USA, 87 : 1874-1878.
- 25 Hackland, A.F. et al., 1994, Arch. Virol., 139 : 1-22.
- Hanson, S.F. et al., 1995, Virology, 211 : 1-9.
- Harding, J.C., 1997, American Association of Swine Practitioners, 503.
- Harding, R.M. et al., 1993, Journal of General Virology, 74 : 323-328.
- Harding, J.C. et Clark, E.G., 1997, Swine Health and Production, Vol. 5, N° 5 : 201-
- 30 203.
- Heyraud-Nitschke, F. et al., 1995, Nucleic Acids Research, Vol. 23, N° 6.
- Horner, G.W., 1991, Surveillance 18(5) : 23.

- Houbenweyl, 1974, in *Meuthode der Organischen Chemie*, E. Wunsch Ed., Volume 15-I et 15-II, Thieme, Stuttgart.
- Huygen, K. et al., 1996, *Nature Medicine*, 2(8) : 893-898.
- Innis, M.A. et al., 1990, in *PCR Protocols. A guide to Methods and Applications*. San  
5 Diego : Academic Press.
- Kaneda, et al., 1989, *Science*, 243 : 375.
- Kievitis, T. et al., 1991, *J. Virol. Methods*, 35 : 273-286.
- Kohler, G. et al., 1975, *Nature*, 256(5517) : 495-497.
- Kwoh, D.Y. et al., 1989, *PNAS. USA*, 86 : 1173-1177.
- 10 Ladany, S. et al., 1989, *J. Clin. Microbiol.* 27 : 2778-2783.
- Lazarowitz, S. G. et al., 1989, *The EMBO Journal*, Vol. 8 N° 4 : 1023-1032.
- Luckow, V.A., 1993, *Baculovirus systems for the expression of human gene products*.  
*Curr. Op. Biotechnology* 4 : 564-572.
- Mankertz, A. et al., 1997, *J. Virol.*, 71 : 2562-2566.
- 15 Matthews, J.A. et al., 1988, *Anal. Biochem.*, 169 : 1-25.
- McNeilly, F. et al., 1996, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 49 : 295-306.
- Meehan, B.M. et al., 1997, *J. Gen. Virol.*, 78 : 221-227.
- Merrifield, R.D., 1966, *J. Am. Chem. Soc.*, 88(21) : 5051-5052.
- Midoux, 1993, *Nucleic Acids Research*, 21 : 871-878.
- 20 Miele, E.A. et al., 1983, *J. Mol. Biol.*, 171 : 281-295.
- Murphy, F.A. et al., 1995, *Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Springer-Verlag Wien New York.
- Nayar, G.P. et al., 1997, *Can. Vet. J.* 38(6) : 385-386.
- Olins, P.O., and Lee, S.C., 1993, *Recent advances in heterologous gene expression in E.*  
25 *coli*. *Curr. Op. Biotechnology* 4 : 520-525.
- Pagano et al., 1967, *J. Virol.*, 1 : 891.
- Rolfs, A. et al., 1991, In *PCR Topics. Usage of Polymerase Chain reaction in Genetic and Infectious Disease*. Berlin : Springer-Verlag.
- Sambrook, J. et al., 1989, In *Molecular cloning : A Laboratory Manual*. Cold Spring  
30 Harbor, NY : Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez-Pescador, R., 1988, *J. Clin. Microbiol.*, 26(10) : 1934-1938.



- Segev D., 1992, in «Non-radioactive Labeling and Detection of Biomolecules». Kessler C. Springer Verlag, Berlin, New-York : 197-205.
- Shiver, J.W., 1995, in Vaccines 1995, eds Chanock, R.M. Brown, F. Ginsberg, H.S. & Norrby, E., pp.95-98, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- 5 Tascon, R.E et al., 1996, Nature Medicine, 2(8) : 888-892.
- Tischer, I. et al., 1982, Nature, 295 : 64-66.
- Tischer, I. et al., 1986, Arch. Virol., 91 : 271-276.
- Tischer, I. et al., 1988, Zentralbl Bakteriол Mikrobiol Hyg [A] 270 : 280-287.
- 10 Tischer, I. et al., 1995, Arch. Virol., 140 : 737-743.
- Urdea, M.S., 1988, Nucleic Acids Research, 11 : 4937-4957.
- Walker, G.T. et al., 1992, NAR 20 : 1691-1696.
- Walker, G.T. et al., 1992, PNAS. USA, 89 : 392-396.
- White, B.A. et al., 1997, Methods in Molecular Biology, 67, Humana Press, Towota.
- 15 Zhao, T.M. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 93(13) : 6653-6658.

### REVENDICATIONS

1. Séquence nucléotidique du génome de circovirus MAP choisie parmi les séquences SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10 ou un de leurs  
5 fragments.
2. Séquence nucléotidique de circovirus MAP, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi :
  - a) une séquence nucléotidique de fragment spécifique d'une séquence selon la revendication 1 ;
  - 10 b) une séquence nucléotidique homologue à une séquence nucléotidique telle que définie en a) ;
  - c) une séquence nucléotidique complémentaire d'une séquence nucléotidique telle que définie en a) ou b), et une séquence nucléotidique de leur ARN correspondant ;
  - d) une séquence nucléotidique capable de s'hybrider dans des conditions stringentes  
15 avec une séquence telle que définie en a), b), ou c) ;
  - e) une séquence nucléotidique comprenant une séquence telle que définie en a), b), c) ou d) ; et
  - f) une séquence nucléotidique modifiée d'une séquence nucléotidique telle que définie en a), b), c), d) ou e).
- 20 3. Séquence nucléotidique selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les séquences SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13 ou un de leurs fragments.
4. Séquence nucléotidique selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique choisie parmi :
  - 25 a) une séquence nucléotidique selon la revendication 3 ;
  - b) une séquence nucléotidique de fragment spécifique d'une séquence telle que définie en a) ;
  - c) une séquence nucléotidique homologue comportant au moins 80 % d'identité avec une séquence nucléotidique telle que définie en a) ou b) ;
  - 30 d) une séquence nucléotidique complémentaire ou d'ARN correspondant à une séquence telle que définie en a), b) ou c) ; et

- e) une séquence nucléotidique modifiée d'une séquence telle que définie en a), b), c), ou d).

5 5. Séquence nucléotidique selon l'une des revendications 2 à 4, caractérisée en ce que la séquence nucléotidique de fragment spécifique comprend une séquence nucléotidique choisie parmi les séquences suivantes :

- a) 5' TGTGGCGA 3' ;
- b) 5' AGTTTCT 3' ;
- c) 5' TCATTTAGAGGGTCTTTCAG 3' ;
- d) 5' GTCAACCT 3' ;
- 10 e) 5' GTGGTTGC 3' ;
- f) 5' AGCCCAGG 3' ;
- g) 5' TTGGCTGG 3' ;
- h) 5' TCIAGCTCIGGT 3' ;
- i) 5' ATCTCAGCTCGT 3' ;
- 15 j) 5' TGTCCTCCTCTT 3' ;
- k) 5' TCTCTAGA 3' ;
- l) 5' TGTACCAA 3' ;
- m) 5' TCCGTCTT 3' ; et leur séquence complémentaire.

20 6. Polypeptide codé par une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 5.

7. Polypeptide selon la revendication 6, caractérisé en ce que sa séquence est représentée par un fragment spécifique d'une des six séquences d'acides aminés représentées à la figure 2 ou à la figure 8.

25 8. Polypeptide selon la revendication 6 ou 7, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les polypeptides de séquences SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16 ou un de leurs fragments.

9. Polypeptide caractérisé en ce qu'il comprend un polypeptide choisi parmi :

- a) un fragment spécifique d'au moins 5 acides aminés d'un polypeptide selon l'une des revendications 6 à 8 ;
- 30 b) un polypeptide homologue à un polypeptide tel que défini en a) ;

c) un fragment spécifique biologiquement actif d'un polypeptide tel que défini en a) ou b) ; et

d) un polypeptide modifié d'un polypeptide tel que défini en a), b) ou c).

10. Polypeptide selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il comprend un polypeptide choisi parmi les polypeptides de séquences SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19 et SEQ ID N° 20.

11. Séquence nucléotidique codant pour un polypeptide selon les revendications 7 à 10.

12. Séquence nucléotidique utilisable comme amorce ou sonde, caractérisée en ce que ladite séquence est choisie parmi les séquences nucléotidiques selon l'une des revendications 1 à 5, et 11.

13. Séquence nucléotidique selon la revendication 12, caractérisée en ce que ladite séquence est l'une des amorces de couple d'amorces choisie parmi les couples suivants :

- 15 a) 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3', et  
5' TGG AAT GTT AAC GAG CTG AG 3' ;
- b) 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3', et  
5' CTC GCA GCC ATC TTG GAA TG 3' ;
- c) 5' CGC GCG TAA TAC GAC TCA CT 3', et  
20 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3' ;
- d) 5' CGC GCG TAA TAC GAC TCA CT 3', et  
5' CTC GCA GCC ATC TTG GAA TG 3' ;
- e) 5' CCT GTC TAC TGC TGT GAG TAC CTT GT 3', et  
5' GCA GTA GAC AGG TCA CTC CGT TGT CC 3'.

25 14. Séquence nucléotidique selon la revendication 12, caractérisée en ce que ladite séquence est une séquence consensus spécifique de circovirus porcin autre que circovirus MAP et en ce qu'elle est l'une des amorces du couple d'amorces suivant :

- a) 5' GTG TGC TCG ACA TTG GTG TG 3', et  
5' TGG AAT GTT AAC TAC CTC AA 3'.

30 15. Séquence nucléotidique selon la revendication 12, caractérisée en ce que ladite séquence est une séquence consensus spécifique de circovirus porcin autre que circovirus MAP de type B et en ce qu'elle est l'une des amorces du couple d'amorces

suivant :

- a) 5' GGC GGC GCC ATC TGT AAC GGT TT 3', et  
5' GAT GGC GCC GAA AGA CGG GTA TC 3'.

16. Séquence nucléotidique selon l'une des revendications 12 à 15, caractérisée en ce qu'elle est marquée par un composé radioactif ou par un composé non radioactif.

17. Séquence nucléotidique selon l'une des revendications 12 à 16, caractérisée en ce qu'elle est immobilisée sur un support, de manière covalente ou non covalente.

18. Séquence nucléotidique selon l'une des revendications 12 à 17, pour la détection et/ou l'amplification de séquences nucléiques.

19. Vecteur de clonage, et/ou d'expression, caractérisé en ce qu'il contient une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 5, et 11.

20. Vecteur caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 5, et 11, et en ce qu'il comprend en outre un gène d'intérêt.

21. Particule ou pseudoparticule virale générée à partir d'un vecteur selon l'une des revendications 19 et 20.

22. Cellule hôte, caractérisée en ce qu'elle est transformée par un vecteur selon l'une des revendications 19 et 20, ou une particule virale selon la revendication 21.

23. Animal, comprenant une cellule transformée selon la revendication 22.

24. Procédé de préparation d'un polypeptide recombinant, caractérisé en ce qu'il met en oeuvre un vecteur selon l'une des revendications 19 et 20, une cellule transformée par ledit vecteur et/ou un animal comprenant ladite cellule transformée.

25. Procédé de préparation d'un polypeptide synthétique, caractérisé en ce qu'il utilise une séquence d'acides aminés d'un polypeptide selon l'une des revendications 6 à 10.

26. Polypeptide recombinant ou synthétique obtenu par un procédé selon la revendication 24 ou 25.

27. Polypeptide hybride, caractérisé en ce qu'il comporte au moins la séquence d'un polypeptide selon l'une des revendications 6 à 10, et 26 et une séquence

d'un polypeptide susceptible d'induire une réponse immunitaire chez l'homme ou l'animal.

28. Polypeptide hybride selon la revendication 27, caractérisé en ce qu'il comporte au moins la séquence d'un polypeptide selon l'une des revendications 6 à 10, et 26, et une séquence d'un polypeptide susceptible d'induire une réponse humorale et/ou cellulaire chez l'homme ou l'animal.

29. Séquence nucléotidique codant pour un polypeptide hybride selon l'une des revendications 27 et 28.

30. Vecteur caractérisé en ce qu'il contient une séquence nucléotidique selon la revendication 29.

31. Polypeptide hybride selon l'une des revendications 27 et 28, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un polypeptide recombinant obtenu par la mise en oeuvre d'un vecteur selon la revendication 30.

32. Procédé pour la détection et/ou l'identification de circovirus MAP, de circovirus porcin autre qu'un circovirus MAP ou de circovirus porcin autre que le circovirus MAP de type B, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) mise en contact de l'échantillon biologique avec un polypeptide selon l'une des revendications 6 à 10, et 26 ;
- b) mise en évidence du complexe antigène-anticorps éventuellement formé.

33. Procédé selon la revendication 32 pour la détection et/ou l'identification de circovirus MAP de type B dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) mise en contact de l'échantillon biologique avec un polypeptide selon la revendication 10 ;
- b) mise en évidence du complexe antigène-anticorps éventuellement formé.

34. Kit ou nécessaire pour la détection et/ou l'identification de circovirus MAP, de circovirus porcin autre qu'un circovirus MAP ou de circovirus porcin autre que le circovirus MAP de type B, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :

- a) un polypeptide selon l'une des revendications 6 à 10, et 26 ;

- b) le cas échéant, les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réaction immunologique ;
- c) le cas échéant, les réactifs permettant mise en évidence des complexes antigène-anticorps éventuellement formés entre le ou les polypeptides de l'invention et les anticorps ;
- d) le cas échéant, un échantillon biologique de référence (témoin négatif) dépourvu d'anticorps reconnus par ledit polypeptide ;
- e) le cas échéant, un échantillon biologique de référence (témoin positif) contenant une quantité prédéterminée d'anticorps reconnus par ledit polypeptide.

35. Anticorps mono- ou polyclonaux, leurs fragments, ou anticorps chimériques, caractérisés en ce qu'ils sont capables de reconnaître spécifiquement un polypeptide selon l'une des revendications 6 à 10, et 26.

36. Anticorps selon la revendication 35, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un anticorps marqué.

37. Procédé pour la détection et/ou l'identification de circovirus MAP, de circovirus porcin autre qu'un circovirus MAP ou de circovirus porcin autre que le circovirus MAP de type B, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) mise en contact de l'échantillon biologique avec un anticorps selon l'une des revendications 35 ou 36 ;
- b) mise en évidence du complexe antigène-anticorps formé.

38. Kit ou nécessaire pour la détection et/ou l'identification de circovirus MAP, de circovirus porcin autre qu'un circovirus MAP ou de circovirus porcin autre que le circovirus MAP de type B, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :

- a) un anticorps polyclonal ou monoclonal selon l'une des revendications 35 ou 36 ;
- b) le cas échéant, les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réaction immunologique ;
- c) les réactifs permettant la mise en évidence des complexes antigène-anticorps produits par la réaction immunologique.

39. Procédé de détection et/ou d'identification de circovirus MAP, de circovirus porcin autre qu'un circovirus MAP ou de circovirus porcin autre que le

circovirus MAP de type B, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il met en oeuvre une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 12 à 18.

40. Procédé selon la revendication 39, caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

- 5 a) le cas échéant, isolement de l'ADN à partir de l'échantillon biologique à analyser ;
- b) amplification spécifique de l'ADN de circovirus MAP à l'aide d'au moins une amorce selon l'une des revendications 12 à 18 ;
- c) mise en évidence des produits d'amplification.

10 41. Procédé selon la revendication 39, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) mise en contact d'une sonde nucléotidique selon l'une des revendications 12 à 18 avec un échantillon biologique, l'ADN contenu dans l'échantillon biologique ayant, le cas échéant, préalablement été rendu accessible à l'hybridation, dans des conditions permettant l'hybridation de la sonde à l'ADN de l'échantillon ;
- 15 b) mise en évidence de l'hybride éventuellement formé entre la sonde nucléotidique et l'ADN de l'échantillon biologique.

42. Procédé selon la revendication 39, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 20 a) mise en contact d'une sonde nucléotidique immobilisée sur un support selon la revendication 17, avec un échantillon biologique, l'ADN de l'échantillon, ayant, le cas échéant, été préalablement rendu accessible à l'hybridation, dans des conditions permettant l'hybridation de la sonde à l'ADN de l'échantillon ;
- b) mise en contact de l'hybride formé entre la sonde nucléotidique immobilisée sur un support et l'ADN contenu dans l'échantillon biologique, le cas échéant après
- 25 élimination de l'ADN de l'échantillon biologique n'ayant pas hybridé avec la sonde, avec une sonde nucléotidique marquée selon la revendication 16 ;
- c) mise en évidence du nouvel hybride formé à l'étape b).

43. Procédé selon la revendication 41 ou 42, caractérisé en ce que, préalablement à l'étape a), l'ADN de l'échantillon biologique, est amplifié à l'aide d'au

30 moins une amorce selon l'une des revendications 12 à 15.

44. Kit ou nécessaire pour la détection et/ou l'identification de circovirus MAP, de circovirus porcin autre qu'un circovirus MAP ou de circovirus porcin autre



que le circovirus MAP de type B, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :

- a) une sonde nucléotidique selon l'une des revendications 12 à 18 ;
- b) le cas échéant, les réactifs nécessaires à la mise en oeuvre d'une réaction d'hybridation ;
- c) le cas échéant, au moins une amorce selon l'une des revendications 12 à 18, ainsi que les réactifs nécessaires à une réaction d'amplification de l'ADN.

45. Kit ou nécessaire pour la détection et/ou l'identification de circovirus MAP, de circovirus porcin autre qu'un circovirus MAP ou de circovirus porcin autre que le circovirus MAP de type B, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :

- a) une sonde nucléotidique, dite sonde de capture, selon la revendication 17 ;
- b) une sonde oligonucléotidique, dite sonde de révélation, selon la revendication 16 ;
- c) le cas échéant, au moins une amorce selon l'une des revendications 12 à 18, ainsi que les réactifs nécessaires à une réaction d'amplification de l'ADN.

46. Kit ou nécessaire pour la détection et/ou l'identification de circovirus MAP, de circovirus porcin autre qu'un circovirus MAP ou de circovirus porcin autre que le circovirus MAP de type B, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments suivants :

- a) au moins une amorce selon l'une des revendications 12 à 18 ;
- b) le cas échéant, les réactifs nécessaires pour effectuer une réaction d'amplification d'ADN ;
- c) le cas échéant, un composant permettant de vérifier la séquence du fragment amplifié, plus particulièrement une sonde oligonucléotidique selon l'une des revendications 12 à 18.

47. Procédé ou kit ou nécessaire selon l'une des revendications 32 à 34, ou 37 à 46, pour le diagnostic d'une infection par un circovirus MAP, par un circovirus porcin autre qu'un circovirus MAP ou par un circovirus porcin autre que le circovirus MAP de type B.

48. Utilisation d'une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 5, et 11, d'un polypeptide selon l'une des revendications 6 à 10, 26, d'un anticorps selon l'une des revendications 35 et 36, d'une cellule selon la revendication 22, et/ou

d'un animal transformé selon la revendication 23, pour la sélection de composés organiques ou inorganiques capables de moduler, d'induire ou d'inhiber l'expression de gènes, et/ou de modifier la réplication cellulaire de circovirus MAP ou capable d'induire ou d'inhiber chez le porc les pathologies liées à une infection par un circovirus MAP.

49. Méthode de sélection de composé capable de se lier à un polypeptide selon l'une des revendications 6 à 10, 26, capable de se lier à une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 5, et 11, ou capable de reconnaître un anticorps selon la revendication 35, et/ou capable de moduler, d'induire ou d'inhiber l'expression de gènes, et/ou de modifier la réplication cellulaire de circovirus MAP, ou capable d'induire ou d'inhiber chez le porc les pathologies liées à une infection par un circovirus MAP, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

- a) mise en contact dudit composé avec ledit polypeptide, ladite séquence nucléotidique, avec une cellule transformée selon la revendication 22, et/ou administration dudit composé à un animal transformé selon la revendication 23 ;
- b) détermination de l'activité dudit composé.

50. Composé susceptible d'être sélectionné par une méthode selon la revendication 49.

51. Composition pharmaceutique comprenant un composé choisi parmi les composés suivants :

- a) une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 5, 11 et 29 ;
- b) un polypeptide selon l'une des revendications 6 à 10, 26 à 28, et 31 ;
- c) un vecteur ou une particule virale selon l'une des revendications 19 à 21, et 30, ou une cellule selon la revendication 22 ;
- d) un anticorps selon la revendication 35 ; et
- e) un composé selon la revendication 50.

52. Composition selon la revendication 51, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable et, le cas échéant, un ou plusieurs adjuvants de l'immunité appropriés.

53. Composition vaccinale, caractérisée en ce qu'elle comprend un composé choisi parmi les composés suivants :

- a) une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 1 à 5, 11 et 29 ;

- b) un polypeptide selon l'une des revendications 6 à 10, 26 à 28, et 31 ;
- c) un vecteur ou une particule virale selon l'une des revendications 19 à 21, et 30 ; et
- d) une cellule selon la revendication 22.

54. Composition vaccinale selon la revendication 53, caractérisée en ce qu'elle comprend un mélange d'au moins deux desdits composés et en ce que l'un des deux desdits composés est relatif au circovirus MAP de type A et l'autre relatif au circovirus MAP de type B.

55. Composition vaccinale, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins l'un des composés suivants :

- une séquence nucléotidique SEQ ID N° 11, SEQ ID N°12, ou un de leurs fragments ;
- un polypeptide de séquence SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, ou un de leurs fragments ;
- un vecteur ou une particule virale comprenant une séquence nucléotidique SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, ou un de leurs fragments ;
- une cellule transformée capable d'exprimer un polypeptide de séquences SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, ou un de leurs fragments ; ou
- un mélange de deux au moins desdits composés.

56. Composition vaccinale selon la revendication 54 ou 55, caractérisée en ce qu'elle comprend ledit mélange de deux au moins desdits composés comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps pour la prévention ou le traitement d'infection par un circovirus MAP.

57. Composition vaccinale selon la revendication 55 ou 56, caractérisée en ce que ledit mélange comprend les composées suivants :

- un plasmide pcDNA3 contenant un acide nucléique de séquence SEQ ID N° 11 ;
- un plasmide pcDNA3 contenant un acide nucléique de séquence SEQ ID N°12 ;
- un plasmide pcDNA3 contenant un acide nucléique codant pour la protéine GM-CSF ;
- un baculovirus recombinant contenant un acide nucléique de séquence SEQ ID N° 11 ;

- un baculovirus recombinant contenant un acide nucléique de séquence SEQ ID N° 12 ; et

- le cas échéant, un adjuvant de l'immunité approprié, notamment l'adjuvant AIE™.

5           58. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 51 à 57, pour la prévention ou le traitement d'une infection par un circovirus MAP.

          59. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 54 à 58 pour la prévention ou le traitement d'une infection par le circovirus MAP de type B.

          60. Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 51 à 59  
10 pour la préparation d'un médicament destinée à la prévention ou le traitement d'infection par un circovirus MAP.

          61. Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 54 à 57 pour la préparation d'un médicament destinée à la prévention ou le traitement d'infection par le circovirus MAP de type B.

15           62. Vecteur selon l'une des revendications 19, 20 et 30, particule virale selon la revendication 21, ou cellule selon la revendication 22, pour le traitement et/ou la prévention d'une maladie par thérapie génique.

          63. Utilisation d'un vecteur selon l'une des revendications 19, 20 et 30, d'une particule virale selon la revendication 21, ou d'une cellule selon la revendication  
20 22, pour la préparation d'un médicament destinée au traitement et/ou la prévention d'une maladie par thérapie génique.

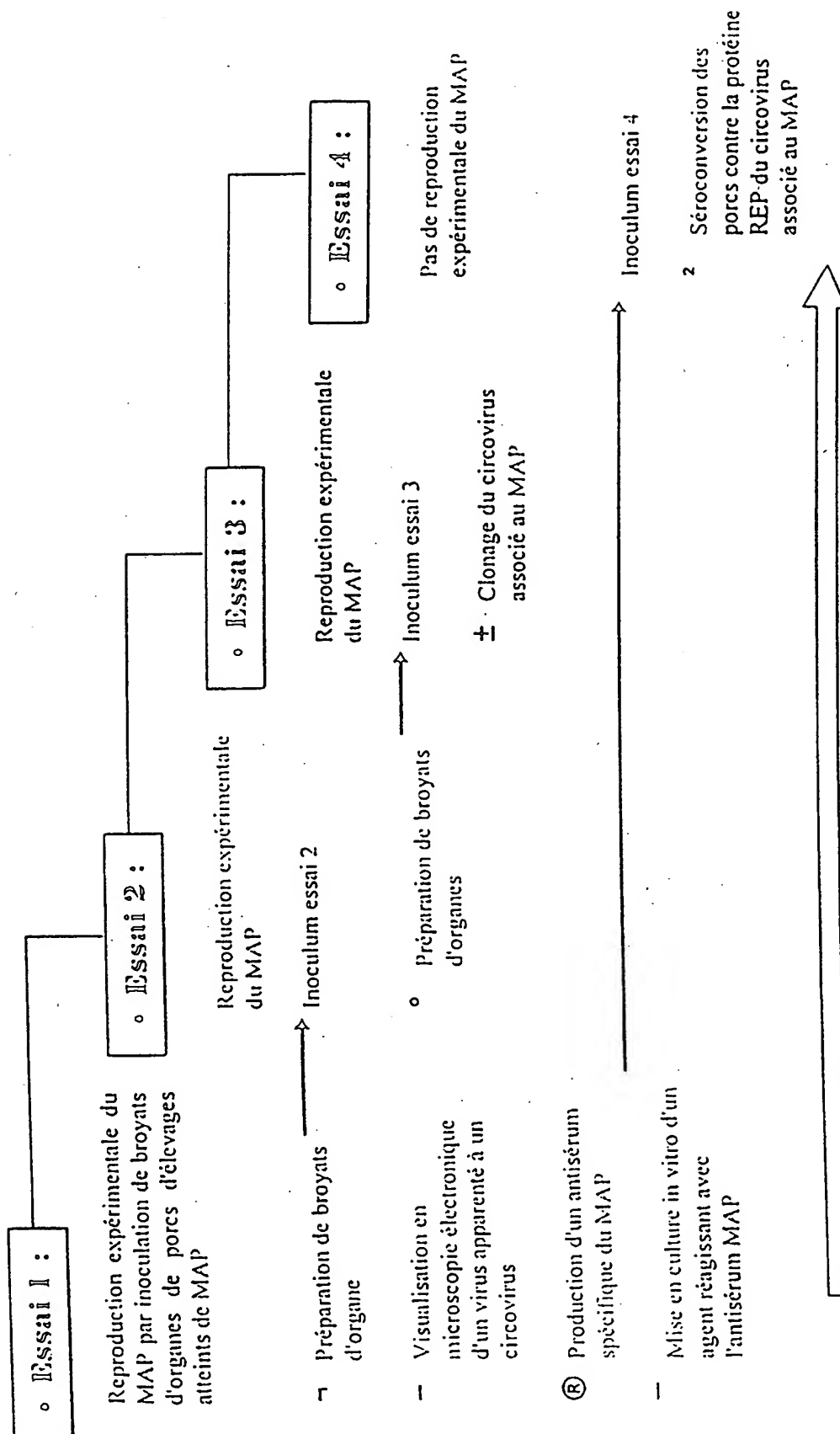


FIGURE 1

2/26

Leu Ala Ser Arg Cys Arg Cys Cys Arg Pro Leu Thr Leu Ser Phe Ala Leu Cys  
 Trp Arg Val Glu Ala Ala Ala Ala Gly Arg Cys Arg \*\*\* His Phe His Trp Ala  
 Gly Ala Cys Lys Pro Leu Pro Leu Val Glu Ala Ala Asp Thr Phe Ile Gly Leu  
 ---  
 3' TGG TCG CGT GAA GCC GTC GCC GTC GTG GAG CCG TCG CAG TCA CTT TTA CGG TTC  
           9          18          27          36          45          54  
 5' ACC AGC GCA CTT CGG CAG CGG CAG CAC CTC GGC AGC GTC AGT GAA AAT GCC AAG  
 ---  
 Thr Ser Ala Leu Arg Gln Arg Gln His Leu Gly Ser Val Ser Glu Asn Ala Lys  
 Pro Ala His Phe Gly Ser Gly Ser Thr Ser Ala Ala Ser Val Lys Met Pro Ser  
 Gln Arg Thr Ser Ala Ala Ala Ala Pro Arg Gln Arg Gln \*\*\* Lys Cys Gln Ala  
  
 Ser Phe Arg Gly Ala Val Gly Tyr Ser Thr Pro Thr \*\*\* Gly \*\*\* Tyr Asp Lys  
 Leu Phe Ala Ala Arg Leu Gly Met Leu Pro Pro His Glu Gly Lys Ile Ile Arg  
 Leu Phe Leu Pro Gly Cys Gly Trp Leu Leu His Thr Asn Val Arg Leu Leu Gly  
 ---  
 GTT CTT TTC GCC GGG CGT TGG GGT ATT CTC CAC CCA CAA GTG GGA ATT ATT AGG  
           63          72          81          90          99          108  
 CAA GAA AAG CGG CCC GCA ACC CCA TAA GAG GTG GGT GTT CAC CCT TAA TAA TCC  
 ---  
 Gln Glu Lys Arg Pro Ala Thr Pro \*\*\* Glu Val Gly Val His Pro \*\*\* \*\*\* Ser  
 Lys Lys Ser Gly Pro Gln Pro His Lys Arg Trp Val Phe Thr Leu Asn Asn Pro  
 Arg Lys Ala Ala Arg Asn Pro Ile Arg Gly Gly Cys Ser Pro Leu Ile Ile Leu  
  
 Arg Pro Pro Ser Phe Cys Phe Val Pro Ala Glu Leu Arg Gly Lys Gln Asn Asn  
 Gly Leu Leu Leu Phe Val Phe Tyr Pro Leu Lys Trp Asp Gly Lys Lys Ile Ile  
 Glu Ser Ser Ser Phe Phe Leu Ile Arg Ser Ser Gly Ile Glu Arg Lys Ser \*\*\*  
 ---  
 AAG GCT CCT CCT CTT TTT GTT TTA TGC CCT CGA AGG TTA GAG GGA AAA ACT AAT  
           117          126          135          144          153          162  
 TTC CGA GGA GGA GAA AAA CAA AAT ACG GGA GCT TCC AAT CTC CCT TTT TGA TTA  
 ---  
 Phe Arg Gly Gly Glu Lys Gln Asn Thr Gly Ala Ser Asn Leu Pro Phe \*\*\* Leu  
 Ser Glu Glu Glu Lys Asn Lys Ile Arg Glu Leu Pro Ile Ser Leu Phe Asp Tyr  
 Pro Arg Arg Arg Lys Thr Lys Tyr Gly Ser Phe Gln Ser Pro Phe Leu Ile Ile  
  
 Gln Lys His Arg Pro Leu Asn Pro Leu Pro Tyr Phe Glu Glu Gly Gly Pro Thr  
 Lys Asn Thr Ala Leu Phe Thr Gln Phe Leu Thr Ser Ser Arg Val Glu Leu Pro  
 Lys Thr Gln Pro Ser Ser Pro Lys Ser Ser Pro Leu Val Gly \*\*\* Arg Trp Pro  
 ---  
 AAA ACA AAC ACC GCT CCT TCC AAA CCT TCT CCC ATC TTG AGG AGT GGA GGT CCC  
           171          180          189          198          207          216  
 TTT TGT TTG TGG CGA GGA AGG TTT GGA AGA GGG TAG AAC TCC TCA CCT CCA GGG  
 ---  
 Phe Cys Leu Trp Arg Gly Arg Phe Gly Arg Gly \*\*\* Asn Ser Ser Pro Pro Gly  
 Phe Val Cys Gly Glu Gly Leu Glu Gly Glu Gly Arg Thr Pro His Leu Gln Gly  
 Leu Phe Val Ala Arg Lys Val Trp Lys Arg Val Glu Leu Leu Thr Ser Arg Gly  
  
 Gln Ser Asn Gln \*\*\* Ser Ala Ser Lys \*\*\* Cys Pro Ser Thr Thr Asn Gln His  
 Lys Arg Ile Lys Ser Leu Leu Leu Ser Lys Val Leu His Leu Pro Ile Lys Thr  
 Asn Ala Phe Lys Ala Leu Phe Cys Val Lys Leu Leu Thr Phe His Tyr Lys Pro  
 ---  
 CAA ACG CTT AAA ACG ATT CTT CGT CTG AAA ATT GTT CCA CTT CAC CAT AAA ACC  
           225          234          243          252          261          270  
 GTT TGC GAA TTT TGC TAA GAA GCA GAC TTT TAA CAA GGT GAA GTG GTA TTT TGG  
 ---  
 Val Cys Glu Phe Cys \*\*\* Glu Ala Asp Phe \*\*\* Gln Gly Glu Val Val Phe Trp  
 Phe Ala Asn Phe Ala Lys Lys Gln Thr Phe Asn Lys Val Lys Trp Tyr Phe Gly  
 Leu Arg Ile Leu Leu Arg Ser Arg Leu Leu Thr Arg \*\*\* Ser Gly Ile Leu Val

FIGURE 2

3/26

Gly Ser Gly Cys Arg Ser Leu Ser Leu Phe Arg Gly Ala Ser Tyr Leu Ile Ser  
 Gly Ala Ala Val Asp Leu Phe Arg Phe Ser Gly Val Leu Leu Ile Phe Phe Val  
 Ala Arg Gln Trp Met Ser Phe Ala Phe Pro Val Ser Trp Cys Phe Leu Ser Tyr  
 ---  
 ACG GGC GAC GGT GTA GCT CTT TCG CTT TCC TTG GCT GGT CGT CTT ATT TCT TAT  
 279 288 297 306 315 324  
 TGC CCG CTG CCA CAT CGA GAA AGC GAA AGG AAC CGA CCA GCA GAA TAA AGA ATA  
 ---  
 Cys Pro Leu Pro His Arg Glu Ser Glu Arg Asn Arg Pro Ala Glu \*\*\* Arg Ile  
 Ala Arg Cys His Ile Glu Lys Ala Lys Gly Thr Asp Gln Gln Asn Lys Glu Tyr  
 Pro Ala Ala Thr Ser Arg Lys Arg Lys Glu Pro Thr Ser Arg Ile Lys Asn Thr  
  
 Cys Tyr Leu Leu Gly Cys Val \*\*\* Arg Thr His Leu Glu Ala Ser Gly Pro Ser  
 Ala Thr Phe Phe Ala Val Tyr Lys Asp Leu Thr Ser Ser Arg Pro Val Leu Pro  
 Gln Leu Leu Ser Pro Trp Met Ser Ile Ser His Pro Ala Gly Arg Phe Trp Pro  
 ---  
 GAC GTC ATT TCT TCC GGT GTA TGA ATA GCT CAC ACC TCG AGG CGC CTT GGT CCC  
 333 342 351 360 369 378  
 CTG CAG TAA AGA AGG CCA CAT ACT TAT CGA GTG TGG AGC TCC GCG GAA CCA GGG  
 ---  
 Leu Gln \*\*\* Arg Arg Pro His Thr Tyr Arg Val Trp Ser Ser Ala Glu Pro Gly  
 Cys Ser Lys Glu Gly His Ile Leu Ile Glu Cys Gly Ala Pro Arg Asn Gln Gly  
 Ala Val Lys Lys Ala Thr Tyr Leu Ser Ser Val Glu Leu Arg Gly Thr Arg Gly  
  
 Ala Cys Arg Gly Thr \*\*\* Gln Gln Ser Tyr Gly Lys Pro Ser Pro Thr Lys Pro  
 Leu Ala Ala Val Gln Arg Ser Ser His Thr Gly Lys Gln Leu Arg Pro Arg Gln  
 Phe Arg Leu Ser Arg Asp Val Ala Thr Leu Val Arg Lys Ser Val Pro Asp Lys  
 ---  
 CTT CGC GTC GCT GGA CAG ATG ACG ACA CTC ATG GGA AAA CCT CTG CCC CAG AAA  
 387 396 405 414 423 432  
 GAA GCG CAG CGA CCT GTC TAC TGC TGT GAG TAC CCT TTT GGA GAC GGG GTC TTT  
 ---  
 Glu Ala Gln Arg Pro Val Tyr Cys Cys Glu Tyr Pro Phe Gly Asp Gly Val Phe  
 Lys Arg Ser Asp Leu Ser Thr Ala Val Ser Thr Leu Leu Glu Thr Gly Ser Leu  
 Ser Ala Ala Thr Cys Leu Leu Leu \*\*\* Val Pro Phe Trp Arg Arg Gly Leu Trp  
  
 Ser Gln Leu Arg Ala Thr Glu Gln Leu Thr His Ser Phe Asn Gly Arg Ala Pro  
 His Ser Tyr Gly Leu Leu Lys Arg Tyr Arg Ile His Ser Ile Glu Ala Pro Gln  
 Thr Val Thr Ala Ser Cys Asn Gly Thr Val Tyr Thr Leu Phe Lys Arg Pro Ser  
 ---  
 CCA CTG ACA TCG GCT CGT CAA AGG ACA TTG CAT ACA CTC TTT AAA GGC GCC CGA  
 441 450 459 468 477 486  
 GGT GAC TGT AGC CGA GCA GTT TCC TGT AAC GTA TGT GAG AAA TTT CCG CGG GCT  
 ---  
 Gly Asp Cys Ser Arg Ala Val Ser Cys Asn Val Cys Glu Lys Phe Pro Arg Ala  
 Val Thr Val Ala Glu Gln Phe Pro Val Thr Tyr Val Arg Asn Phe Arg Gly Leu  
 \*\*\* Leu \*\*\* Pro Ser Ser Phe Leu \*\*\* Arg Met \*\*\* Glu Ile Ser Ala Gly Trp  
  
 Gln Val Lys Ser Leu Ser Arg Ser Ser Ala Ala Ala His Asn Ser Ser Leu Gln  
 Ser Phe Lys Gln Phe His Ala Pro Leu His Leu Leu Thr Ile Pro Leu Cys Ser  
 Ala Ser Ser Lys Phe Thr Leu Pro Phe Ile Cys Cys Arg Ser Gln Phe Val Ala  
 ---  
 CCG ACT TGA AAA CTT TCA CTC GCC CTT CTA CGT CGT CGC ACT AAC CTT CTG TCG  
 495 504 513 522 531 540  
 GGC TGA ACT TTT GAA AGT GAG CGG GAA GAT GCA GCA GCG TGA TTG GAA GAC AGC  
 ---  
 Gly \*\*\* Thr Phe Glu Ser Glu Arg Glu Asp Ala Ala Ala \*\*\* Leu Glu Asp Ser  
 Ala Glu Leu Leu Lys Val Ser Gly Lys Met Gln Gln Arg Asp Trp Lys Thr Ala  
 Leu Asn Phe \*\*\* Lys \*\*\* Ala Gly Arg Cys Ser Ser Val Ile Gly Arg Gln Leu

FIGURE 2 (suite 1)

4/26

Val Arg \*\*\* Leu Pro Gly Ala Arg Asn His Ser Ser Gly Thr Pro Gly Tyr Asn  
 Tyr Val Asp Tyr His Ala Arg Gly Thr Thr Pro Leu Ala Leu Pro Gly Thr Ile  
 Thr Cys Thr Met Thr Pro Gly Gly Pro Gln Pro Phe Leu Trp His Ala Arg Leu  
 ---  
 ACA TGT GCA GTA TCA CCC GGG CGG GCC AAC ACC CTT CTC GGT CAC CCG GGC ATT  
           549                  558                  567                  576                  585                  594  
 TGT ACA CGT CAT AGT GGG CCC GCC CGG TTG TGG GAA GAG CCA GTG GGC CCG TAA  
 ---  
 Cys Thr Arg His Ser Gly Pro Ala Arg Leu Trp Glu Glu Pro Val Gly Pro \*\*\*  
 Val His Val Ile Val Gly Pro Pro Gly Cys Gly Lys Ser Gln Trp Ala Arg Asn  
 Tyr Thr Ser \*\*\* Trp Ala Arg Pro Val Val Gly Arg Ala Ser Gly Pro Val Ile

Gln Gln Ala \*\*\* Pro Cys Arg Ser Ser Ala \*\*\* Tyr Phe Tyr Thr Thr Pro His  
 Lys Ser Leu Arg Pro Val Gly Val Pro Leu Arg Thr Ser Ile Leu Pro Pro Ile  
 Lys Ala Ser Gly Leu Ser Val \*\*\* Gln Phe Gly Leu Leu Phe Leu His His Ser  
 ---  
 AAA ACG ACT CGG ATC CCT GTG GAT GAC CTT CGG ATC ATC TTT ATT CAC CAC CCT  
           603                  612                  621                  630                  639                  648  
 TTT TGC TGA GCC TAG GGA CAC CTA CTG GAA GCC TAG TAG AAA TAA GTG GTG GGA  
 ---  
 Phe Cys \*\*\* Ala \*\*\* Gly His Leu Leu Glu Ala \*\*\* \*\*\* Lys \*\*\* Val Val Gly  
 Phe Ala Glu Pro Arg Asp Thr Tyr Trp Lys Pro Ser Arg Asn Lys Trp Trp Asp  
 Leu Leu Ser Leu Gly Thr Pro Thr Gly Ser Leu Val Glu Ile Ser Gly Gly Met

Ile Asp His Leu Leu Leu Gln Gln Lys Pro His Asn Lys His Ser Thr Val Lys  
 Ser Ile Met Ser Phe Phe Asn Asn Asn Gln Ile Ile Lys Ile Ala Pro \*\*\* Arg  
 Pro Tyr \*\*\* Pro Ser Ser Thr Thr Thr Lys Ser Ser Lys \*\*\* Pro Gln Asn Gly  
 ---  
 ACC TAT AGT ACC TCT TCT TCA ACA ACA AAA CCT ACT AAA AAT ACC GAC CAA TGG  
           657                  666                  675                  684                  693                  702  
 TGG ATA TCA TGG AGA AGA AGT TGT TGT TTT GGA TGA TTT TTA TGG CTG GTT ACC  
 ---  
 Trp Ile Ser Trp Arg Arg Ser Cys Cys Phe Gly \*\*\* Phe Leu Trp Leu Val Thr  
 Gly Tyr His Gly Glu Glu Val Val Val Leu Asp Asp Phe Tyr Gly Trp Leu Pro  
 Asp Ile Met Glu Lys Lys Leu Leu Phe Trp Met Ile Phe Met Ala Gly Tyr Leu

Pro His Asp Val Ser Val Thr His Gly Thr Asp Met Ser Gln Leu Ser \*\*\* Leu  
 Pro Ile Ile \*\*\* Gln Ser Gln Thr Val Pro Ile Trp Gln Ser Tyr Leu Ser Phe  
 Gln Ser Ser Arg Ser Leu Ser His Ser Arg Tyr Gly Asn Val Thr Ser Val Leu  
 ---  
 AAC CCT ACT AGA TGA CTC TGA CAC ACT GGC CAT AGG TAA CTG ACA TCT CTG ATT  
           711                  720                  729                  738                  747                  756  
 TTG GGA TGA TCT ACT GAG ACT GTG TGA CCG GTA TCC ATT GAC TGT AGA GAC TAA  
 ---  
 Leu Gly \*\*\* Ser Thr Glu Thr Val \*\*\* Pro Val Ser Ile Asp Cys Arg Asp \*\*\*  
 Trp Asp Asp Leu Leu Arg Leu Cys Asp Arg Tyr Pro Leu Thr Val Glu Thr Lys  
 Gly Met Ile Tyr \*\*\* Asp Cys Val Thr Gly Ile His \*\*\* Leu \*\*\* Arg Leu Lys

Pro Tyr Gln Glu Lys Lys Pro Gly Cys Tyr Lys Ser \*\*\* Trp Cys Asp Pro Gly  
 Pro Thr Ser Asn Arg Lys Gln Gly Ala Thr Asn Gln Asn Gly Ala Ile Leu Gly  
 Pro Pro Val Thr Gly Lys Lys Ala Arg Leu Ile Lys Ile Val Leu Leu \*\*\* Ala  
 ---  
 TCC CCC ATG ACA AGG AAA AAA CCG GGC GTC ATA AAA CTA ATG GTC GTT AGT CCG  
           765                  774                  783                  792                  801                  810  
 AGG GGG TAC TGT TCC TTT TTT GGC CCG CAG TAT TTT GAT TAC CAG CAA TCA GGC  
 ---  
 Arg Gly Tyr Cys Ser Phe Phe Gly Pro Gln Tyr Phe Asp Tyr Gln Gln Ser Gly  
 Gly Gly Thr Val Pro Phe Leu Ala Arg Ser Ile Leu Ile Thr Ser Asn Gln Ala  
 Gly Val Leu Phe Leu Phe Trp Pro Ala Val Phe \*\*\* Leu Pro Ala Ile Arg Pro

FIGURE 2 (suite 2)



5/26

Gly Pro Ile Thr Ser Arg Leu Gln Gln Gly Leu Gln Leu Leu Glu Arg Asp Ser  
 Gly Leu Phe Pro Val Gly \*\*\* Ser Ser Asp Trp Ser Tyr Phe Ser Glu Ile Pro  
 Gly Trp Ser His Tyr Glu Glu Val Ala Thr Gly Ala Thr Ser Ala Arg \*\*\* Arg  
 ---  
 GGG GGT CCT TAC CAT GAG GAG TTG ACG ACA GGG TCG ACA TCT TCG AGA GAT AGC  
 819 828 837 846 855 864  
 CCC CCA GGA ATG GTA CTC CTC AAC TGC TGT CCC AGC TGT AGA AGC TCT CTA TCG  
 ---  
 Pro Pro Gly Met Val Leu Leu Asn Cys Cys Pro Ser Cys Arg Ser Ser Leu Ser  
 Pro Gln Glu Trp Tyr Ser Ser Thr Ala Val Pro Ala Val Glu Ala Leu Tyr Arg  
 Pro Arg Asn Gly Thr Pro Gln Leu Leu Ser Gln Leu \*\*\* Lys Leu Ser Ile Gly

Ser \*\*\* \*\*\* Lys Ala Ile Lys Ser Ser Gln Gln Leu Val Ile Trp Pro Pro Val  
 Pro Asn Ser Ser Gln Leu Lys Pro Leu Ser Ser Ser Phe Leu Gly Arg Leu Tyr  
 Leu Ile Val Val Lys Cys Asn Gln Phe Val Ala Pro Ser Cys Asp Val Ser Thr  
 ---  
 CTC CTA ATG ATG AAA CGT TAA AAC CTT CTG ACG ACC TCT TGT TAG GTG CCT CCA  
 873 882 891 900 909 918  
 GAG GAT TAC TAC TTT GCA ATT TTG GAA GAC TGC TGG AGA ACA ATC CAC GGA GGT  
 ---  
 Glu Asp Tyr Tyr Phe Ala Ile Leu Glu Asp Cys Trp Arg Thr Ile His Gly Gly  
 Arg Ile Thr Thr Leu Gln Phe Trp Lys Thr Ala Gly Glu Gln Ser Thr Glu Val  
 Gly Leu Leu Leu Cys Asn Phe Gly Arg Leu Leu Glu Asn Asn Pro Arg Arg Tyr

Arg Leu Gly Ile Gln Leu Leu Pro Gly Val Arg His Gly Lys Gly Met Tyr Phe  
 Gly Phe Ala Ser Lys Phe Cys His Val Trp Gly Thr Gly Lys Glu Trp Ile Phe  
 Gly Ser Pro Arg Asn Ser Ala Thr Ser Gly Gly Gln Ala Arg Lys Gly Tyr Leu  
 ---  
 TGG GCT TCC GGC TAA ACT TCG TCA CCT GGG TGG GAC ACG GGA AAA GGG TAT ATT  
 927 936 945 954 963 972  
 ACC CGA AGG CCG ATT TGA AGC AGT GGA CCC ACC CTG TGC CCT TTT CCC ATA TAA  
 ---  
 Thr Arg Arg Pro Ile \*\*\* Ser Ser Gly Pro Thr Leu Cys Pro Phe Pro Ile \*\*\*  
 Pro Glu Gly Arg Phe Glu Ala Val Asp Pro Pro Cys Ala Leu Phe Pro Tyr Lys  
 Pro Lys Ala Asp Leu Lys Lys Gln Trp Thr His Pro Val Pro Phe Ser His Ile Lys

Leu Asn Ser Leu Arg Lys Gln \*\*\* \*\*\* Met Thr Ile Thr Lys Ile Lys Ile \*\*\*  
 Tyr Ile Val Ser Asp Lys Lys Asn Asp Cys Arg Leu Pro Lys \*\*\* Lys \*\*\* Glu  
 Ile Phe \*\*\* Gln Thr Lys Lys Thr Ile Val Asp Tyr His Asn Lys Asn Lys Asn  
 ---  
 TTA TTT AAT GAC TCA GAA AAA ACA ATA GTG TAG CAT TAC CAA AAA TAA AAA TAA  
 981 990 999 1008 1017 1026  
 AAT AAA TTA CTG AGT CTT TTT TGT TAT CAC ATC GTA ATG GTT TTT ATT TTT ATT  
 ---  
 Asn Lys Leu Leu Ser Leu Phe Cys Tyr His Ile Val Met Val Phe Ile Phe Ile  
 Ile Asn Tyr \*\*\* Val Phe Phe Val Ile Thr Ser \*\*\* Trp Phe Leu Phe Leu Phe  
 \*\*\* Ile Thr Glu Ser Phe Leu Leu Ser His Arg Asn Gly Phe Tyr Phe Tyr Ser

Lys Ser Pro Arg Glu Pro Tyr Ile Arg Gln Ile Thr Cys Leu Tyr Asp Val Lys  
 Asn Leu Pro Asp Lys Leu Ile Phe Glu Arg Phe Gln Val Tyr Ile Thr Leu Arg  
 Met \*\*\* Leu Thr Lys \*\*\* Ser Leu Asn Glu Ser Asn Tyr Met Phe Leu \*\*\* Gly  
 ---  
 GTA AAT CTC CCA GAA AGT CCT ATT TAA GAG ACT TAA CAT GTA TTT ATC AGT TGG  
 1035 1044 1053 1062 1071 1080  
 CAT TTA GAG GGT CTT TCA GGA TAA ATT CTC TGA ATT GTA CAT AAA TAG TCA ACC  
 ---  
 His Leu Glu Gly Leu Ser Gly \*\*\* Ile Leu \*\*\* Ile Val His Lys \*\*\* Ser Thr  
 Ile \*\*\* Arg Val Phe Gln Asp Lys Phe Ser Glu Leu Tyr Ile Asn Ser Gln Pro  
 Phe Arg Gly Ser Phe Arg Ile Asn Ser Leu Asn Cys Thr \*\*\* Ile Val Asn Leu

FIGURE 2 (suite 3)

6/26

Gly Cys Leu Lys Pro Ser His Asn Cys Lys Pro Ala Cys Leu Gly Pro Arg His  
 Val Val Tyr Asn Gln Ala Thr Thr Ala Asn Gln Leu Ala Tyr Gly Leu Gly Thr  
 \*\*\* Trp Met Ile Lys Pro Gln Pro Gln Met Lys Ser Arg Met Ala Trp Ala Gln  
 ---  
 AAT GGT GTA TTA AAA CCC GAC ACC AAC GTA AAA CCT CGC GTA TCG GGT CCG GAC  
 1089 1098 1107 1116 1125 1134  
 TTA CCA CAT AAT TTT GGG CTG TGG TTG CAT TTT GGA GCG CAT AGC CCA GGC CTG  
 ---  
 Leu Pro His Asn Phe Gly Leu Trp Leu His Phe Gly Ala His Ser Pro Gly Leu  
 Tyr His Ile Ile Leu Gly Cys Gly Cys Ile Leu Glu Arg Ile Ala Gln Ala Cys  
 Thr Thr \*\*\* Phe Trp Ala Val Val Ala Phe Trp Ser Ala \*\*\* Pro Arg Pro Val

Ala Arg Cys Gln His Pro Tyr Lys Phe Pro Ala Val Ala Pro Lys Lys \*\*\* \*\*\*  
 His Glu Val Asn Thr His Thr Asn Leu His Leu Trp Leu Gln Asn Arg Lys Asn  
 Thr Ser Ser Met Pro Thr Pro Ile \*\*\* Ile Ser Gly Cys Ser Thr Glu Lys Ile  
 ---  
 ACA CGA GCT GTA ACC ACA CCC ATA AAT TTA CCT CGG TGT CGA CCA AAG AAA ATA  
 1143 1152 1161 1170 1179 1188  
 TGT GCT CGA CAT TGG TGT GGG TAT TTA AAT GGA GCC ACA GCT GGT TTC TTT TAT  
 ---  
 Cys Ala Arg His Trp Cys Gly Tyr Leu Asn Gly Ala Thr Ala Gly Phe Phe Tyr  
 Val Leu Asp Ile Gly Val Gly Ile \*\*\* Met Glu Pro Gln Leu Val Ser Phe Ile  
 Cys Ser Thr Leu Val Trp Val Phe Lys Trp Ser His Ser Trp Phe Leu Leu Leu

Lys Ala Pro Val Leu \*\*\* Asn Asn Pro Arg Ala Arg Thr Gln Pro His Leu Val  
 Asn Pro Gln Phe Trp Asp Ile Thr Gln Asp Leu Glu Pro Lys Pro Thr Phe Tyr  
 Ile Gln Ser Ser Gly Ile Leu Gln Lys Thr \*\*\* Ser Gln Asn Pro Pro Ser Thr  
 ---  
 ATA AAC CGA CCT TGG TTA GTT AAC AAA CCA GAT CGA GAC CAA ACC CCC ACT TCA  
 1197 1206 1215 1224 1233 1242  
 TAT TTG GCT GGA ACC AAT CAA TTG TTT GGT CTA GCT CTG GTT TGG GGG TGA AGT  
 ---  
 Tyr Leu Ala Gly Thr Asn Gln Leu Phe Gly Leu Ala Leu Val Trp Gly \*\*\* Ser  
 Ile Trp Leu Glu Pro Ile Asn Cys Leu Val \*\*\* Leu Trp Phe Gly Gly Glu Val  
 Phe Gly Trp Asn Gln Ser Ile Val Trp Ser Ser Ser Gly Leu Gly Val Lys Tyr

Gln Leu Pro Leu Tyr Leu Ala Ala Lys His His Pro Pro Leu Leu Leu \*\*\* Tyr  
 Arg Ser His Tyr Thr Phe Pro Gln Arg Ile Thr His Arg Ser Ser Tyr Asn Ile  
 Gly Pro Thr Thr Pro Leu Pro Ser Gly \*\*\* Pro Thr Ala Pro Pro Thr Thr Leu  
 ---  
 TGG ACC TCA CCA TCC ATT TCC CGA CGG AAT ACC ACA CCG CCC TCC TCA TCA ATT  
 1251 1260 1269 1278 1287 1296  
 ACC TGG AGT GGT AGG TAA AGG GCT GCC TTA TGG TGT GGC GGG AGG AGT AGT TAA  
 ---  
 Thr Trp Ser Gly Arg \*\*\* Arg Ala Ala Leu Trp Cys Gly Gly Arg Ser Ser \*\*\*  
 Pro Gly Val Val Gly Lys Gly Leu Pro Tyr Gly Val Ala Gly Gly Val Val Asn  
 Leu Glu Trp \*\*\* Val Lys Gly Cys Leu Met Val Trp Arg Glu Glu \*\*\* Leu Ile

Leu Pro \*\*\* Leu Gly Leu Gln His Leu Pro Asn Cys Leu Gln Cys Gly Leu Tyr  
 Tyr Pro Asp Tyr Ala Leu Asn Thr Ser Pro Thr Val Phe Asn Ala Asp Leu Ile  
 Ile Pro Thr Met Pro Trp Thr Pro Pro Pro Pro \*\*\* Leu Thr Pro Met Trp Ser  
 ---  
 ATA TCC CCA GTA TCC GGT TCA ACC ACC TCC CCC AAT GTT TCA ACC GTA GGT TCT  
 1305 1314 1323 1332 1341 1350  
 TAT AGG GGT CAT AGG CCA AGT TGG TGG AGG GGG TTA CAA AGT TGG CAT CCA AGA  
 ---  
 Tyr Arg Gly His Arg Pro Ser Trp Trp Arg Gly Leu Gln Ser Trp His Pro Arg  
 Ile Gly Val Ile Gly Gln Val Gly Gly Gly Gly Tyr Lys Val Gly Ile Gln Asp  
 \*\*\* Gly Ser \*\*\* Ala Lys Leu Val Glu Gly Val Thr Lys Leu Ala Ser Lys Ile

FIGURE 2 (suite 4)

7/26

Cys Cys His Val Trp Cys Arg Lys Ser \*\*\* Leu His His Pro Arg Gln Pro Leu  
Val Val Thr Ser Gly Val Gly Arg Gln Asn Ser Thr Ile Pro Asp Arg Pro Tyr  
Leu Leu Leu Pro Gly Leu Val Glu Lys Ile Leu Pro Ser Pro Thr Glu Pro Thr

ATT GTT GTC ACC TGG GTT GTG GAG AAA CTA ATC TCC ACT ACC CCA GAG ACC CCA  
1359 1368 1377 1386 1395 1404  
TAA CAA CAG TGG ACC CAA CAC CTC TTT GAT TAG AGG TGA TGG GGT CTC TGG GGT

\*\*\* Gln Gln Trp Thr Gln His Leu Phe Asp \*\*\* Arg \*\*\* Trp Gly Leu Trp Gly  
Asn Asn Ser Gly Pro Asn Thr Ser Leu Ile Arg Gly Asp Gly Val Ser Gly Val  
Thr Thr Val Asp Pro Thr Pro Leu \*\*\* Leu Glu Val Met Gly Ser Leu Gly \*\*\*

Ile \*\*\* Ile \*\*\* Gly Lys \*\*\* Tyr Pro Leu Ile Pro Phe Thr Pro Thr Pro Pro  
Phe Glu Tyr Lys Ala Lys Arg Ile Arg Tyr Tyr Gln Phe Pro Leu Pro Leu Pro  
Phe Asn Met Asn Leu Arg Glu Leu Val Thr Thr Asn Ser Leu Tyr Pro Tyr Pro

TTT TAA GTA TAA ATC GGA AAG ATT ATG CCA TCA TAA CCT TTC CAT CCC CAT CCC  
1413 1422 1431 1440 1449 1458  
AAA ATT CAT ATT TAG CCT TTC TAA TAC GGT AGT ATT GGA AAG GTA GGG GTA GGG

Lys Ile His Ile \*\*\* Pro Phe \*\*\* Tyr Gly Ser Ile Gly Lys Val Gly Val Gly  
Lys Phe Ile Phe Ser Leu Ser Asn Thr Val Val Leu Glu Arg \*\*\* Gly \*\*\* Gly  
Asn Ser Tyr Leu Ala Phe Leu Ile Arg \*\*\* Tyr Trp Lys Gly Arg Gly Arg Gly

Gln His Arg Arg Leu Pro Pro Pro Val Pro Arg His Gln Ile Glu Ala Arg \*\*\*  
Asn Thr Gly Ser Pro Pro Leu Phe Gln Gly Ile Asn Phe Arg Leu Glu Asn  
Thr Pro Ala Ala Gln Pro Pro Ser Ser Ser Ala Ser Thr Ser Asp \*\*\* Ser Thr

CCA ACC ACG GCG GAC TCC CCC CCT CCT TGA CCG GCT ACA ACT TAG AGT CGA GCA  
1467 1476 1485 1494 1503 1512  
GGT TGG TGC CGC CTG AGG GGG GGA GGA ACT GGC CGA TGT TGA ATC TCA GCT CGT

Gly Trp Cys Arg Leu Arg Gly Gly Gly Thr Gly Arg Cys \*\*\* Ile Ser Ala Arg  
Val Gly Ala Ala \*\*\* Gly Gly Glu Glu Leu Ala Asp Val Glu Ser Gln Leu Val  
Leu Val Pro Pro Glu Gly Gly Arg Asn Trp Pro Met Leu Asn Leu Ser Ser Leu

Cys Glu Leu Ile Ala Ala Leu Thr Arg Arg Lys His His Thr Cys Ile Arg \*\*\*  
Val Asn Trp Ser Pro Gln Ser His Gly Gly Arg Ile Thr Leu Val Phe Glu Arg  
Leu Met Gly Leu His Ser Arg Thr Asp Glu Glu \*\*\* Pro Ser Tyr Leu Asn Glu

ATT GTA AGG TTC TAC CGA CGC TCA CAG GAG GAG AAT ACC ACT CAT GTT TAA GAG  
1521 1530 1539 1548 1557 1566  
TAA CAT TCC AAG ATG GCT GCG AGT GTC CTC CTC TTA TGG TGA GTA CAA ATT CTC

\*\*\* His Ser Lys Met Ala Ala Ser Val Leu Leu Leu Trp \*\*\* Val Gln Ile Leu  
Asn Ile Pro Arg Trp Leu Arg Val Ser Ser Ser Tyr Gly Glu Tyr Lys Phe Ser  
Thr Phe Gln Asp Gly Cys Glu Cys Pro Pro Leu Met Val Ser Thr Asn Ser Leu

Phe Pro Pro Phe Gln Leu Tyr Gly Asp Lys Pro Ala Met Gln Leu Pro Lys Gln  
Ser Leu Arg Ser Asn Phe Ile Gly Thr Lys Arg Arg Trp Arg Tyr Arg Asn Arg  
Leu Phe Ala Pro Ile Ser Ser Val Arg Arg Glu Ala Gly Asp Thr Val Thr Glu

ATC TTT CCG CCC TTA ACT TCT ATG GGC AGA AAG CCG CGG TAG ACA TTG CCA AAG  
1575 1584 1593 1602 1611 1620  
TAG AAA GGC GGG AAT TGA AGA TAC CCG TCT TTC GGC GCC ATC TGT AAC GGT TTC

\*\*\* Lys Gly Gly Asn \*\*\* Arg Tyr Pro Ser Phe Gly Ala Ile Cys Asn Gly Phe  
Arg Lys Ala Gly Ile Glu Asp Thr Arg Leu Ser Ala Pro Ser Val Thr Val Ser  
Glu Arg Arg Glu Leu Lys Ile Pro Val Phe Arg Arg His Leu \*\*\* Arg Phe Leu

FIGURE 2 (suite 5)

8/26

Leu Arg Pro Thr Gly Phe Ile Thr Lys Glu Pro Pro His Lys Trp Ser Pro Gln  
 Phe Ala Pro His Val Leu Tyr Pro Arg Arg Arg Leu Ile Asn Gly Leu His Ser  
 Ser Pro Pro Thr Tyr Trp Ile His Asp Glu Gly Ser Ser Thr Glu Leu Ile Ala  
 ---  
 ACT TCC GCC CCA CAT GGT TTA TAC CAG AAG AGG CCT CCT ACA AAG GTT CTA CCG  
 1629 1638 1647 1656 1665 1674  
 TGA AGG CGG GGT GTA CCA AAT ATG GTC TTC TCC GGA GGA TGT TTC CAA GAT GGC  
 ---  
 \*\*\* Arg Arg Gly Val Pro Asn Met Val Phe Ser Gly Gly Cys Phe Gln Asp Gly  
 Glu Gly Gly Val Tyr Gln Ile Trp Ser Ser Pro Glu Asp Val Ser Lys Met Ala  
 Lys Ala Gly Cys Thr Lys Tyr Gly Leu Leu Arg Arg Met Phe Pro Arg Trp Leu

Pro Pro Pro Asp Thr Lys Gln Pro Leu Ala Glu Lys Ala Val Asp Asp \*\*\* Leu  
 Arg Pro Arg Thr Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Pro Trp Thr Met Arg Tyr  
 Ala Pro Ala Pro Gly Asp Glu Ala Thr Val Gly Gly Gln Gly Arg \*\*\* Gly Ile  
 ---  
 ACG CCC CCG CCC AGG CAG AAG ACG CCA TTG CGG AGG AAC CGG TGC AGT AGG ATA  
 1683 1692 1701 1710 1719 1728  
 TGC GGG GGC GGG TCC GTC TTC TGC GGT AAC GCC TCC TTG GCC ACG TCA TCC TAT  
 ---  
 Cys Gly Gly Gly Ser Val Phe Cys Gly Asn Ala Ser Leu Ala Thr Ser Ser Tyr  
 Ala Gly Ala Gly Pro Ser Ser Ala Val Thr Pro Pro Trp Pro Arg His Pro Ile  
 Arg Gly Arg Val Arg Leu Leu Arg \*\*\* Arg Leu Leu Gly His Val Ile Leu \*\*\*

Leu Ser Leu Leu Ala Ser Ser Tyr Tyr  
 Phe His Phe Phe His Ala Ala Thr Thr Asn  
 Phe Thr Phe Ser Thr Arg Gln Gln Leu Ile  
 ---  
 TTT TCA CTT TCT TCA CGC GAC GAC ATC ATA A 5'  
 1737 1746 1755  
 AAA AGT GAA AGA AGT GCG CTG CTG TAG TAT T 3'  
 ---  
 Lys Ser Glu Arg Ser Ala Leu Leu \*\*\* Tyr  
 Lys Val Lys Glu Val Arg Cys Cys Ser Ile  
 Lys \*\*\* Lys Lys Cys Ala Ala Val Val

9/26

		10	20	30	40	50	
circopormank	1	ACCAGCGCAC	TTCCGGCAGCG	GCAGCACCTC	GGCAGCGTCA	GTGAAATGC	50
circopormeeh	1	ACCAGCGCAC	TTCCGGCAGCG	GCAGCACCTC	GGCAGCGTCA	GTGAAATGC	50
circopordfp	1	ACCAGCGCAC	TTCCGGCAGCG	GCAGCACCTC	GGCAGCGTCA	GTGAAATGC	50
		60	70	80	90	100	
circopormank	51	CAAGCAAGAA	AAGCGGCCCG	CAACCCCATATA	AGAGGTGGGT	TTCCACCCTT	100
circopormeeh	51	CAAGCAAGAA	AAGCGGCCCG	CAACCCCATATA	AGAGGTGGGT	TTCCACCCTT	100
circopordfp	51	CAAGCAAGAA	AAGCGGCCCG	CAACCCCATATA	AGAGGTGGGT	TTCCACCCTT	100
		110	120	130	140	150	
circopormank	101	AATAATCCTT	CCGAGGAGGA	GAAAAACAAA	ATACGGGAGC	TTCCAATCTC	150
circopormeeh	101	AATAATCCTT	CCGAGGAGGA	GAAAAACAAA	ATACGGGAGC	TTCCAATCTC	150
circopordfp	101	AATAATCCTT	CCGAGGAGGA	GAAAAACAAA	ATACGGGAGC	TTCCAATCTC	150
		160	170	180	190	200	
circopormank	151	CTTTTTGAT	TATTTTGT	CCGGAGAGGA	AGGTTTGGAA	GAGGGTAGAA	200
circopormeeh	151	CTTTTTGAT	TATTTTGT	CCGGAGAGGA	AGGTTTGGAA	GAGGGTAGAA	200
circopordfp	151	CTTTTTGAT	TATTTTGT	CCGGAGAGGA	AGGTTTGGAA	GAGGGTAGAA	200
		210	220	230	240	250	
circopormank	201	CTCTCACCT	CCAGGGGTTT	GCTAATTTTG	CTAAGAAGCA	GACTTTTAAC	250
circopormeeh	201	CTCTCACCT	CCAGGGGTTT	GCTAATTTTG	CTAAGAAGCA	GACTTTTAAC	250
circopordfp	201	CTCTCACCT	CCAGGGGTTT	GCTAATTTTG	CTAAGAAGCA	GACTTTTAAC	250
		260	270	280	290	300	
circopormank	251	AAGGTGAAGT	GGTATTTTGG	TGCCCCGTGC	CACATCGAGA	AAGCGAAAGG	300
circopormeeh	251	AAGGTGAAGT	GGTATTTTGG	TGCCCCGTGC	CACATCGAGA	AAGCGAAAGG	300
circopordfp	251	AAGGTGAAGT	GGTATTTTGG	TGCCCCGTGC	CACATCGAGA	AAGCGAAAGG	300
		310	320	330	340	350	
circopormank	301	AACCGACCAG	CAGAATAAAG	AATACTGCAG	TAAAGAAGGC	CACATACTTA	350
circopormeeh	301	AACCGACCAG	CAGAATAAAG	AATACTGCAG	TAAAGAAGGC	CACATACTTA	350
circopordfp	301	AACCGACCAG	CAGAATAAAG	AATACTGCAG	TAAAGAAGGC	CACATACTTA	350
		360	370	380	390	400	
circopormank	351	TCGAGTGTGG	AGCTCCGCGG	AACCAGGGGA	AGCGCAGCGA	CTGTCTACT	400
circopormeeh	351	TCGAGTGTGG	AGCTCCGCGG	AACCAGGGGA	AGCGCAGCGA	CTGTCTACT	400
circopordfp	351	TCGAGTGTGG	AGCTCCGCGG	AACCAGGGGA	AGCGCAGCGA	CTGTCTACT	400
		410	420	430	440	450	
circopormank	401	GCTGTGAGTA	CCCTTTTGGG	SACGGGGTCT	TTGGTGACTG	TAGCCGAGCA	450
circopormeeh	401	GCTGTGAGTA	CCCTTTTGGG	SACGGGGTCT	TTGGTGACTG	TAGCCGAGCA	450
circopordfp	401	GCTGTGAGTA	CCCTTTTGGG	SACGGGGTCT	TTGGTGACTG	TAGCCGAGCA	450
		460	470	480	490	500	
circopormank	451	GTTCCTGTA	ACGTATGTGA	GAAATTTCCG	CGGGCTGGCT	GAACTTTTGA	500
circopormeeh	451	GTTCCTGTA	ACGTATGTGA	GAAATTTCCG	CGGGCTGGCT	GAACTTTTGA	500
circopordfp	451	GTTCCTGTA	ACGTATGTGA	GAAATTTCCG	CGGGCTGGCT	GAACTTTTGA	500
		510	520	530	540	550	
circopormank	501	AAGTGAGCGG	GAAGATGCAG	CAGCGTGATT	GGAAGACAGC	TGTACACGTC	550
circopormeeh	501	AAGTGAGCGG	GAAGATGCAG	CAGCGTGATT	GGAAGACAGC	TGTACACGTC	550
circopordfp	501	AAGTGAGCGG	GAAGATGCAG	CAGCGTGATT	GGAAGACAGC	TGTACACGTC	550
		560	570	580	590	600	
circopormank	551	ATAGTGGGCC	CGCCCCGTTG	TGGGAAGAGC	CAGTGGGCCC	STAATTTTGC	600
circopormeeh	551	ATAGTGGGCC	CGCCCCGTTG	TGGGAAGAGC	CAGTGGGCCC	STAATTTTGC	600
circopordfp	551	ATAGTGGGCC	CGCCCCGTTG	TGGGAAGAGC	CAGTGGGCCC	STAATTTTGC	600

FIGURE 3

10/26

		610	620	630	640	650	
circopormank	601	FGAGCCTAGC	GACACCTACT	GGAAGCCTAG	TAGAAATAAG	TGGTGGGATG	650
circopormeeh	601	FGAGCCTAGG	GACACCTACT	GGAAGCCTAG	TAGAAATAAG	TGGTGGGATG	650
circopordfp	601	FGAGCCTAGG	GACACCTACT	GGAAGCCTAG	TAGAAATAAG	TGGTGGGATG	650
		660	670	680	690	700	
circopormank	651	GATATCATGG	AGAAGAAGTT	GTTGTTTTGG	ATGATTTTAA	TGGCTGGTTA	700
circopormeeh	651	GATATCATGG	AGAAGAAGTT	GTTGTTTTGG	ATGATTTTAA	TGGCTGGTTA	700
circopordfp	651	GATATCATGG	AGAAGAAGTT	GTTGTTTTGG	ATGATTTTAA	TGGCTGGTTA	700
		710	720	730	740	750	
circopormank	701	CCTTGGGATG	ATCTACTGAG	ACTGTGTGAC	CGGTATCCAT	TGACTGTAGA	750
circopormeeh	701	CCTTGGGATG	ATCTACTGAG	ACTGTGTGAC	CGGTATCCAT	TGACTGTAGA	750
circopordfp	701	CCTTGGGATG	ATCTACTGAG	ACTGTGTGAC	CGGTATCCAT	TGACTGTAGA	750
		760	770	780	790	800	
circopormank	751	GACTAAAGGC	GGTACTGTTT	CTTTTTTGGC	TGGCAGTATT	TGATTACCA	800
circopormeeh	751	GACTAAAGGC	GGTACTGTTT	CTTTTTTGGC	TGGCAGTATT	TGATTACCA	800
circopordfp	751	GACTAAAGGC	GGTACTGTTT	CTTTTTTGGC	TGGCAGTATT	TGATTACCA	800
		810	820	830	840	850	
circopormank	801	GCAATCAGGC	CCCCCAGGAA	TGGTACTCCT	CAACTGCTGT	CCCAGCTGTA	850
circopormeeh	801	GCAATCAGGC	CCCCCAGGAA	TGGTACTCCT	CAACTGCTGT	CCCAGCTGTA	850
circopordfp	801	GCAATCAGGC	CCCCCAGGAA	TGGTACTCCT	CAACTGCTGT	CCCAGCTGTA	850
		860	870	880	890	900	
circopormank	851	GAAGCTCTCT	ATCGGAGGAT	TACTACTTTG	CAATTTTGGG	AGACTGCTGG	900
circopormeeh	851	GAAGCTCTCT	ATCGGAGGAT	TACTACTTTG	CAATTTTGGG	AGACTGCTGG	900
circopordfp	851	GAAGCTCTCT	ATCGGAGGAT	TACTACTTTG	CAATTTTGGG	AGACTGCTGG	900
		910	920	930	940	950	
circopormank	901	AGAACAATCA	ACGGAGGTAC	CCGAAGGCCG	ATTTGAAGCA	GTGGACCCAC	950
circopormeeh	901	AGAACAATCC	ACGGAGGTAC	CCGAAGGCCG	ATTTGAAGCA	GTGGACCCAC	950
circopordfp	901	AGAACAATCC	ACGGAGGTAC	CCGAAGGCCG	ATTTGAAGCA	GTGGACCCAC	950
		960	970	980	990	1000	
circopormank	951	CCTGTGCCCT	TTTCCCATAT	AAAATAAATT	ACTGAGTCTT	TTTGTATTATC	1000
circopormeeh	951	CCTGTGCCCT	TTTCCCATAT	AAAATAAATT	ACTGAGTCTT	TTTGTATTATC	1000
circopordfp	951	CCTGTGCCCT	TTTCCCATAT	AAAATAAATT	ACTGAGTCTT	TTTGTATTATC	1000
		1010	1020	1030	1040	1050	
circopormank	1001	ACATCGTAAT	GGTTTTTATT	TTTATTTATT	TAGAGGGTCT	TTTAGGATAA	1050
circopormeeh	1001	ACATCGTAAT	GGTTTTTATT	TTTATTTATT	TAGAGGGTCT	TTTAGGATAA	1050
circopordfp	1001	ACATCGTAAT	GGTTTTTATT	TTTATTTATT	TAGAGGGTCT	TTTAGGATAA	1050
		1060	1070	1080	1090	1100	
circopormank	1051	ATTCTCTGAA	TTGTACATAA	ATAGTCAGCC	TTACCACATA	ATTTTGGGCT	1100
circopormeeh	1051	ATTCTCTGAA	TTGTACATAA	ATAGTCAGCC	TTACCACATA	ATTTTGGGCT	1100
circopordfp	1051	ATTCTCTGAA	TTGTACATAA	ATAGTCAGCC	TTACCACATA	ATTTTGGGCT	1100
		1110	1120	1130	1140	1150	
circopormank	1101	GTGGCTGCAT	TTTGGAGCGC	ATAGCCGAGG	CCTGTGTGCT	CGACATTGGT	1150
circopormeeh	1101	GTGGCTGCAT	TTTGGAGCGC	ATAGCCGAGG	CCTGTGTGCT	CGACATTGGT	1150
circopordfp	1101	GTGGCTGCAT	TTTGGAGCGC	ATAGCCGAGG	CCTGTGTGCT	CGACATTGGT	1150
		1160	1170	1180	1190	1200	
circopormank	1151	GTGGGTATTT	AAATGGAGCC	ACAGCTGGTT	TCTTTTATTA	TTTGGGTGGA	1200
circopormeeh	1151	GTGGGTATTT	AAATGGAGCC	ACAGCTGGTT	TCTTTTATTA	TTTGGGTGGA	1200
circopordfp	1151	GTGGGTATTT	AAATGGAGCC	ACAGCTGGTT	TCTTTTATTA	TTTGGGTGGA	1200

FIGURE 3 (suite 1)

11/26

		1210	1220	1230	1240	1250	
circopormank	1201	ACCAATCAAT	TGTTTGGTCC	AGCTCAGGTT	TGGGGGTGAA	GTACCTGGAG	1250
circopormeeh	1301	ACCAATCAAT	TGTTTGGTCC	AGCTCAGGTT	TGGGGGTGAA	GTACCTGGAG	1250
circopordfp	1201	ACCAATCAAT	TGTTTGGTCC	AGCTCTGGTT	TGGGGGTGAA	GTACCTGGAG	1250
		1260	1270	1280	1290	1300	
circopormank	1251	TGGTAGGTAA	AGGGCTGCCT	TATGGTGTGG	CGGGAGGAGT	AGTTAATATA	1300
circopormeeh	1251	TGGTAGGTAA	AGGGCTGCCT	TATGGTGTGG	CGGGAGGAGT	AGTTAATATA	1300
circopordfp	1251	TGGTAGGTAA	AGGGCTGCCT	TATGGTGTGG	CGGGAGGAGT	AGTTAATATA	1300
		1310	1320	1330	1340	1350	
circopormank	1301	GGGGTCATAG	GCCAAGTTGG	TGGAGGGGGT	TACAAAGTTG	GCATCCAAGA	1350
circopormeeh	1301	GGGGTCATAG	GCCAAGTTGG	TGGAGGGGGT	TACAAAGTTG	GCATCCAAGA	1350
circopordfp	1301	GGGGTCATAG	GCCAAGTTGG	TGGAGGGGGT	TACAAAGTTG	GCATCCAAGA	1350
		1360	1370	1380	1390	1400	
circopormank	1351	TAACAACAGT	GGACCCAACA	CCTCTTTGAT	TAGAGGTGAT	GGGGTCTCTG	1400
circopormeeh	1351	TAACAACAGT	GGACCCAACA	CCTCTTTGAT	TAGAGGTGAT	GGGGTCTCTG	1400
circopordfp	1351	TAACAACAGT	GGACCCAACA	CCTCTTTGAT	TAGAGGTGAT	GGGGTCTCTG	1400
		1410	1420	1430	1440	1450	
circopormank	1401	GGGTAAAATT	CATATTTAGC	CTTTCTAATA	CGGTAGTATT	GGAAAGGTAG	1450
circopormeeh	1401	GGGTAAAATT	CATATTTAGC	CTTTCTAATA	CGGTAGTATT	GGAAAGGTAG	1450
circopordfp	1401	GGGTAAAATT	CATATTTAGC	CTTTCTAATA	CGGTAGTATT	GGAAAGGTAG	1450
		1460	1470	1480	1490	1500	
circopormank	1451	GGGTAGGGGG	TTGGTGCCCG	CTGAGGGGGG	GAGGAAGTGG	CCGATGTTGA	1500
circopormeeh	1451	GGGTAGGGGG	TTGGTGCCCG	CTGAGGGGGG	GAGGAAGTGG	CCGATGTTGA	1500
circopordfp	1451	GGGTAGGGGG	TTGGTGCCCG	CTGAGGGGGG	GAGGAAGTGG	CCGATGTTGA	1500
		1510	1520	1530	1540	1550	
circopormank	1501	ATCTGAGGTG	GTAAACATTC	CAAGATGGCT	GCGAGTATCC	TCCTTTTATG	1550
circopormeeh	1501	ATCTGAGGTG	GTAAACATTC	CAAGATGGCT	GCGAGTATCC	TCCTTTTATG	1550
circopordfp	1501	ATCTGAGGTG	GTAAACATTC	CAAGATGGCT	GCGAGTATCC	TCCTTTTATG	1550
		1560	1570	1580	1590	1600	
circopormank	1551	GTGAGTACAA	ATTCTGTAGA	AAGGCGGGAA	TTGAAGATAC	CCGTCTTTCC	1600
circopormeeh	1551	GTGAGTACAA	ATTCTGTAGA	AAGGCGGGAA	TTGAAGATAC	CCGTCTTTCC	1600
circopordfp	1551	GTGAGTACAA	ATTCTGTAGA	AAGGCGGGAA	TTGAAGATAC	CCGTCTTTCC	1600
		1610	1620	1630	1640	1650	
circopormank	1601	CGGCCATCTG	TAACGGTTTC	TGAAGGCGGG	GTGTGCCAAA	TATGGTCTTC	1650
circopormeeh	1601	CGGCCATCTG	TAACGGTTTC	TGAAGGCGGG	GTGTGCCAAA	TATGGTCTTC	1650
circopordfp	1601	CGGCCATCTG	TAACGGTTTC	TGAAGGCGGG	GTGTGCCAAA	TATGGTCTTC	1650
		1660	1670	1680	1690	1700	
circopormank	1651	TCCGGAGGAT	GTTTCCAAGA	TGGCTGCCGG	GGCGGGTCCT	TCTTCTGCGG	1700
circopormeeh	1651	TCCGGAGGAT	GTTTCCAAGA	TGGCTGCCGG	GGCGGGTCCT	TCTTCTGCGG	1700
circopordfp	1651	TCCGGAGGAT	GTTTCCAAGA	TGGCTGCCGG	GGCGGGTCCT	TCTTCTGCGG	1700
		1710	1720	1730	1740	1750	
circopormank	1701	TAACGCCTCC	TTGGCCACGT	CATCCTATAA	AAGTGAAAGA	AGTGGCCTGC	1750
circopormeeh	1701	TAACGCCTCC	TTGGCCACGT	CATCCTATAA	AAGTGAAAGA	AGTGGCCTGC	1750
circopordfp	1701	TAACGCCTCC	TTGGCCACGT	CATCCTATAA	AAGTGAAAGA	AGTGGCCTGC	1750
		1760	1770	1780	1790	1800	
circopormank	1751	TGTAGTATT	.....	.....	.....	.....	1800
circopormeeh	1751	TGTAGTATT	.....	.....	.....	.....	1800
circopordfp	1751	TGTAGTATT	.....	.....	.....	.....	1800

FIGURE 3 (suite 2)

		10	20	30	40	50	
circopormank	1	MP SKKSGPQP	HKRWVFTLNN	PSEEEKNKIR	ELPISLFDYF	VCGEEGLEEG	50
circopormeeh	1	MP SKKSGPQP	HKRWVFTLNN	PSEEEKNKIR	ELPISLFDYF	VCGEEGLEEG	50
circopordfp[	1	MP SKKSGPQP	HKRWVFTLNN	PSEEEKNKIR	ELPISLFDYF	VCGEEGLEEG	50
		60	70	80	90	100	
circopormank	51	RTAHLQGFAN	FAKKQTFNKV	KWYFGARCHI	EKAKGTDQON	KEYCSKEGHI	100
circopormeeh	51	RTPHLQGFAN	FAKKQTFNKV	KWYFGARCHI	EKAKGTDQON	KEYCSKEGHI	100
circopordfp[	51	RTPHLQGFAN	FAKKQTFNKV	KWYFGARCHI	EKAKGTDQON	KEYCSKEGHI	100
		110	120	130	140	150	
circopormank	101	TECGAPRNQ	GKRSDLSTAV	STLLETGSLV	TVAEQFPVTY	VRNFRGLAEL	150
circopormeeh	101	TECGAPRNQ	GKRSDLSTAV	STLLETGSLV	TVAEQFPVTY	VRNFRGLAEL	150
circopordfp[	101	TECGAPRNQ	GKRSDLSTAV	STLLETGSLV	TVAEQFPVTY	VRNFRGLAEL	150
		160	170	180	190	200	
circopormank	151	KVSGKMQQR	DWKTAVHVIV	GPPGCGKSQW	ARNFAEPSOT	YWKPSRNKWW	200
circopormeeh	151	KVSGKMQQR	DWKTAVHVIV	GPPGCGKSQW	ARNFAEPROT	YWKPSRNKWW	200
circopordfp[	151	KVSGKMQQR	DWKTAVHVIV	GPPGCGKSQW	ARNFAEPROT	YWKPSRNKWW	200
		210	220	230	240	250	
circopormank	201	DGYHGEEVVV	LDDFYGWL PW	ODLLRLCDRY	PLTVETKGGT	VPFLARSILI	250
circopormeeh	201	DGYHGEEVVV	LDDFYGWL PW	ODLLRLCDRY	PLTVETKGGT	VPFLARSILI	250
circopordfp[	201	DGYHGEEVVV	LDDFYGWL PW	ODLLRLCDRY	PLTVETKGGT	VPFLARSILI	250
		260	270	280	290	300	
circopormank	251	TSNQAPQEWY	SSTAVPAVEA	LYRRITTLQF	WKTAGEQSTE	VPEGRFEAVD	300
circopormeeh	251	TSNQAPQEWY	SSTAVPAVEA	LYRRITTLQF	WKTAGEQSTE	VPEGRFEAVD	300
circopordfp[	251	TSNQAPQEWY	SSTAVPAVEA	LYRRITTLQF	WKTAGEQSTE	VPEGRFEAVD	300
		310	320	330	340	350	
circopormank	301	PPCALFPYKI	NY	.....	.....	.....	350
circopormeeh	301	PPCALFPYKI	NY	.....	.....	.....	350
circopordfp[	301	PPCALFPYKI	NY	.....	.....	.....	350

FIGURE 4



13/26

		10	20	30	40	50	
circopormank	1	MTWPRRRYRR	RRTRPRSHLG	NILRRRPYLA	HPAFRNRYRW	RRKTGIFNCR	50
circopormeeh	1	MTWPRRRYRR	RRTRPRSHLG	NILRRRPYLA	HPAFRNRYRW	RRKTGIFNSR	50
circopordfp[	1	MTWPRRRYRR	RRTRPRSHLG	NILRRRPYLV	HPAFRNRYRW	RRKTGIFNSR	50
		60	70	80	90	100	
circopormank	51	LSKEFVLTIK	GGYSQPSWIV	NHLRFNIGQF	LPPSGGTNPL	PLPFQYYRIR	100
circopormeeh	51	LSKEFVLTIK	GGYSQPSWNV	NHLRFNIGQF	LPPSGGTNPL	PLPFQYYRIR	100
circopordfp[	51	LSKEFVLTIK	GGYSQPSWNV	NHLRFNIGQF	LPPSGGTNPL	PLPFQYYRIR	100
		110	120	130	140	150	
circopormank	101	KAKYEFYPRO	PITSNERGVG	STVVILDANF	VTPSTNLAYD	PYINYSSRHT	150
circopormeeh	101	KAKYEFYPRO	PITSNORGVG	STVVILDANF	VTPSTNLAYD	PYINYSSRHT	150
circopordfp[	101	KAKYEFYPRO	PITSNORGVG	STVVILDANF	VTPSTNLAYD	PYINYSSRHT	150
		160	170	180	190	200	
circopormank	151	IRQPFTYHSR	YFTPKEPDLQ	TIWFHPNNK	RNQLWLHLNT	HTNVEHTGLG	200
circopormeeh	151	IRQPFTYHSR	YFTPKEPDLQ	TIWFHPNNK	RNQLWLHLNT	HTNVEHTGLG	200
circopordfp[	151	IRQPFTYHSR	YFTPKEPDLQ	TIWFHPNNK	RNQLWLHLNT	HTNVEHTGLG	200
		210	220	230	240	250	
circopormank	201	YALQNAATAQ	HYVVRLTIYV	QFREFILKDP	LNK*.....	.....	250
circopormeeh	201	YALQNAATAQ	HYVVRLTIYV	QFREFILKDP	LNK*.....	.....	250
circopordfp[	201	YALQNAATAQ	HYVVRLTIYV	QFREFILKDP	LNK*.....	.....	250

FIGURE 5

		10	20	30	40	50	
circopormank	1	MISIPPLIST	RLPVGVARLS	KITGPLALPT	TGRAHYDVYS	CLPITLLHLP	50
circopormeeh	1	MISIPPLIST	RLPVGVPRLS	KITGPLALPT	TGRAHYDVYS	CLPITLLHLP	50
circopordfp[	1	MISIPPLIST	RLPVGVPRLS	KITGPLALPT	TGRAHYDVYS	CLPITLLHLP	50
		60	70	80	90	100	
circopormank	51	AHFQKFSQPA	EISHIRYREL	LGYSHORPRL	QKGTSSROV	AALPLVPRSS	100
circopormeeh	51	AHFQKFSQPA	EISHIRYREL	LGYSHORPRL	QKGTSSROV	AALPLVPRSS	100
circopordfp[	51	AHFQKFSQPA	EISHIRYRK	LGYSHORPRL	QKGTSSROV	AALPLVPRSS	100
		110	120	130	140	150	
circopormank	101	TLDKYVAFFT	AVFFILLVGS	FRFLDVAAGT	KIPLHLVKSL	LSKISKPLE	150
circopormeeh	101	TLDKYVAFFT	AVFFILLVGS	FRFLDVAAGT	KIPLHLVKSL	LSKIRKPLE	150
circopordfp[	101	TLDKYVAFFT	AVFFILLVGS	FRFLDVAAGT	KIPLHLVKSL	LSKIRKPLE	150
		160	170	180	190	200	
circopormank	151	VSSTLFQTF	LSANKIKKG	DWKLPYFVFL	LGRIIKGEH	PPLMGLRAAF	200
circopormeeh	151	VSSTLFQTF	LSANKIKKG	DWKLPYFVFL	LGRIIKGEH	PPLMGLRAAF	200
circopordfp[	151	VSSTLFQTF	LSANKIKKG	DWKLPYFVFL	LGRIIKGEH	PPLMGLRAAF	200
		210	220	230	240	250	
circopormank	201	LAWHFH*...	.....	.....	.....	.....	250
circopormeeh	201	LAWHFH*H...	.....	.....	.....	.....	250
circopordfp[	201	LAWHFH*...	.....	.....	.....	.....	250

FIGURE 6

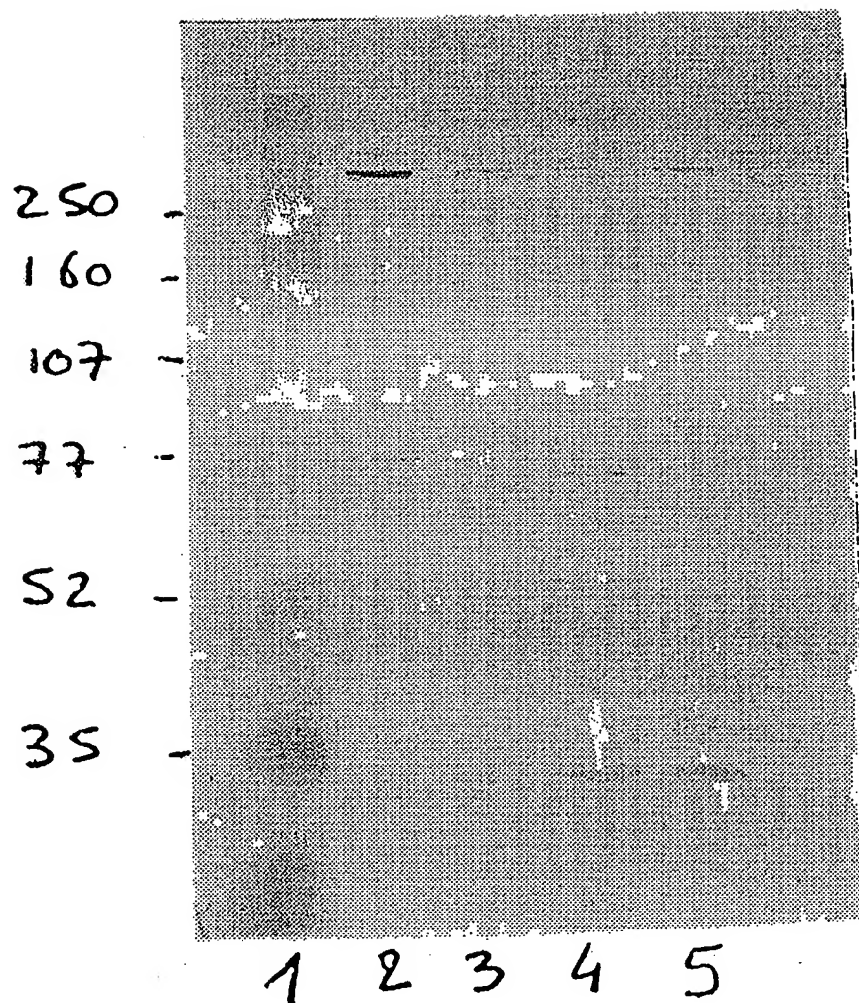


FIGURE 7  
FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

15/26

Leu Ala Ser Arg Cys Arg Cys Cys Arg Pro Leu Val Glu Ala Ala Val His Gly  
 Trp Arg Val Glu Ala Ala Ala Ala Gly Arg Cys Cys Arg Leu Leu Leu Met Gly  
 Gly Ala Cys Lys Pro Leu Pro Leu Val Glu Ala Ala Gly \*\*\* Cys Cys Cys Ala  
 ---  
 3' TGG TCG CGT GAA GCC GTC GCC GTC GTG GAG CCG TCG TGG AGT CGT CGT TGT ACG  
     9      18      27      36      45      54  
 5' ACC AGC GCA CTT CGG CAG CAG CAG CAC CTC GGC AGC ACC TCA GCA GCA ACA TGC  
 ---  
 Thr Ser Ala Leu Arg Gln Arg Gln His Leu Gly Ser Thr Ser Ala Ala Thr Cys  
 Pro Ala His Phe Gly Ser Gly Ser Thr Ser Ala Ala Pro Gln Gln Gln His Ala  
 Gln Arg Thr Ser Ala Ala Ala Ala Pro Arg Gln His Leu Ser Ser Asn Met Pro  
  
 Ala Leu Leu Ile Ser Ser Ala Ser Gly Leu Gly Met Phe Pro Pro His Glu Ser  
 Leu Leu Phe Phe Pro Leu Leu Pro Gly Trp Gly Trp Leu Leu His Thr Asn Val  
 Trp Cys Ser Ser His Phe Phe Arg Val Gly Val Gly Tyr Phe Thr Pro Thr \*\*\*  
 ---  
 GGT CGT TCT TCT TAC CTT CTT CGC CTG GGG TTG GGG TAT TTT CCA CCC ACA AGT  
     63      72      81      90      99      108  
 CCA GCA AGA AGA ATG GAA GAA GCG GAC CCC AAC CCC ATA AAA GGT GGG TGT TCA  
 ---  
 Pro Ala Arg Arg Met Glu Glu Ala Asp Pro Asn Pro Ile Lys Gly Gly Cys Ser  
 Gln Gln Glu Glu Trp Lys Lys Arg Thr Pro Thr Pro \*\*\* Lys Val Gly Val His  
 Ser Lys Lys Asn Gly Arg Ser Gly Pro Gln Pro His Lys Arg Trp Val Phe Thr  
  
 Gln Ile Ile Arg Gly Phe Val Leu Ala Leu Phe Tyr Pro Ile Lys Trp Tyr Gly  
 Arg Phe Leu Gly Glu Ser Ser Ser Arg Leu Phe Ile Arg Ser Arg Gly Ile Asp  
 Glu Ser Tyr Asp Lys Arg Leu Arg Ala Cys Ser Phe Val Pro Asp Glu Leu Ile  
 ---  
 GAG ACT TAT TAG GAA GGC TTC TGC TCG CGT TCT TTT ATG CCC TAG AAG GTT ATA  
     117      126      135      144      153      162  
 CTC TGA ATA ATC CTT CCG AAG ACG AGC GCA AGA AAA TAC GGG ATC TTC CAA TAT  
 ---  
 Leu \*\*\* Ile Ile Leu Pro Lys Thr Ser Ala Arg Lys Tyr Gly Ile Phe Gln Tyr  
 Ser Glu \*\*\* Ser Phe Arg Arg Arg Ala Gln Glu Asn Thr Gly Ser Ser Asn Ile  
 Leu Asn Asn Pro Ser Glu Asp Glu Arg Lys Lys Ile Arg Asp Leu Pro Ile Ser  
  
 \*\*\* Lys Ile Ile Lys Asn Asn Ala Leu Leu Thr Ile Leu Phe Ser Ser Cys Arg  
 Arg Asn Ser \*\*\* Lys Ile Thr Pro Ser Ser Pro Leu Ser Ser Pro Arg Val Gly  
 Gly Ile Gln Asn Asn \*\*\* Gln Gln Arg Pro Pro Tyr His Pro Leu Val Phe Val  
 ---  
 GGG ATA AAC TAA TAA AAT AAC AAC CGC TCC TCC CAT TAC TCC TTC CTG CTT GTG  
     171      180      189      198      207      216  
 CCC TAT TTG ATT ATT TTA TTG TTG GCG AGG AGG GTA ATG AGG AAG GAC GAA CAC  
 ---  
 Pro Tyr Leu Ile Ile Leu Leu Leu Ala Arg Arg Val Met Arg Lys Asp Glu His  
 Pro Ile \*\*\* Leu Phe Tyr Cys Trp Arg Gly Gly \*\*\* \*\*\* Gly Arg Thr Asn Thr  
 Leu Phe Asp Tyr Phe Ile Val Gly Glu Glu Gly Asn Glu Glu Gly Arg Thr Pro  
  
 Val Glu Leu Pro Glu Ser Ile Lys His Leu Leu Leu Ser Lys Ile Phe His Leu  
 \*\*\* Arg Trp Pro Asn Ala Leu Lys Thr Phe Phe Cys Val Lys Leu Leu Thr Phe  
 Glu Gly Gly Pro Thr Arg \*\*\* Asn Gln Ser Ser Ala Ser Lys \*\*\* Tyr Leu Ser  
 ---  
 GAG TGG AGG TCC CCA AGC GAT TAA AAC ACT TCT TCG TCT GAA AAT TAT TTC ACT  
     225      234      243      252      261      270  
 CTC ACC TCC AGG GGT TCG CTA ATT TTG TGA AGA AGC AGA CTT TTA ATA AAG TGA  
 ---  
 Leu Thr Ser Arg Gly Ser Leu Ile Leu \*\*\* Arg Ser Arg Leu Leu Ile Lys \*\*\*  
 Ser Pro Pro Gly Val Arg \*\*\* Phe Cys Glu Glu Ala Asp Phe \*\*\* \*\*\* Ser Glu  
 His Leu Gln Gly Phe Ala Asn Phe Val Lys Lys Gln Thr Phe Asn Lys Val Lys

FIGURE 8

16/26

Pro Ile Gln Thr Gly Ala Ala Val Asp Leu Phe Arg Phe Ser Cys Ile Leu Leu  
 His Tyr Lys Pro Ala Arg Gln Trp Met Ser Phe Ala Phe Pro Val Ser \*\*\* Cys  
 Thr Thr Asn Pro His Gly Ser Gly Cys Arg Ser Leu Ser Leu Phe Leu Asp Ala  
 ---  
 TCA CCA TAA ACC CAC GGG CGA CGG TGT AGC TCT TTC GCT TTC CTT GTC TAG TCG  
 279 288 297 306 315 324  
 AGT GGT ATT TGG GTG CCC GCT GCC ACA TCG AGA AAG CGA AAG GAA CAG ATC AGC  
 ---  
 Ser Gly Ile Trp Val Pro Ala Ala Thr Ser Arg Lys Arg Lys Glu Gln Ile Ser  
 Val Val Phe Gly Cys Pro Leu Pro His Arg Glu Ser Glu Arg Asn Arg Ser Ala  
 Trp Tyr Leu Gly Ala Arg Cys His Ile Glu Lys Ala Lys Gly Thr Asp Gln Gln

Ile Phe Phe Val Ala Thr Phe Phe Ala Val \*\*\* Gln His Leu Thr Ser Ser Arg  
 Phe Leu Ser Tyr Gln Leu Leu Ser Pro Leu Lys Ser Ile Ser His Pro Ala Gly  
 Ser Tyr Leu Ile Ser Cys Tyr Leu Leu Cys Ser Val Ser Pro Thr His Leu Glu  
 ---  
 TCT TAT TTC TTA TGA CGT CAT TTC TTC CGT TGA ATG ACT ACC TCA CAC CTC GAG  
 333 342 351 360 369 378  
 AGA ATA AAG AAT ACT GCA GTA AAG AAG GCA ACT TAC TGA TGG AGT GTG GAG CTC  
 ---  
 Arg Ile Lys Asn Thr Ala Val Lys Lys Ala Thr Tyr \*\*\* Trp Ser Val Glu Leu  
 Glu \*\*\* Arg Ile Leu Gln \*\*\* Arg Arg Gln Leu Thr Asp Gly Val Trp Ser Ser  
 Asn Lys Glu Tyr Cys Ser Lys Glu Gly Asn Leu Leu Met Glu Cys Gly Ala Pro

Ser Arg Leu Ser Leu Pro Thr Val Gln Arg Ser Ser His Thr Gly Gln Gln Leu  
 Leu Asp \*\*\* Pro Cys Arg Val Leu Ser Arg Asp Val Ala Thr Leu Val Lys Asn Ser  
 \*\*\* Ile Glu Pro Val Val Ser His Gly Thr \*\*\* Gln Gln Ser Tyr Arg Thr Pro  
 ---  
 GAT CTA GAG TCC CTG TTG CCT CAC TGG ACA GAT GAC GAC ACT CAT GGA ACA ACC  
 387 396 405 414 423 432  
 CTA GAT CTC AGG GAC AAC GGA GTG ACC TGT CTA CTG CTG TGA GTA CCT TGT TGG  
 ---  
 Leu Asp Leu Arg Asp Asn Gly Val Thr Cys Leu Leu Leu \*\*\* Val Pro Cys Trp  
 \*\*\* Ile Ser Gly Thr Thr Glu \*\*\* Pro Val Tyr Cys Cys Glu Tyr Leu Val Gly  
 Arg Ser Gln Gly Gln Arg Ser Asp Leu Ser Thr Ala Val Ser Thr Leu Leu Glu

Ala Pro Thr Gln His Gly Asn Cys Leu Leu Val Arg Tyr Arg Lys Asp Ser Ile  
 Leu Pro Leu Arg Thr Val Thr Ala Ser Cys Cys Gly Thr Val Asn Thr Leu Phe  
 Ser Arg Ser Asp Pro Ser Arg Gln Leu Ala Ala Gly Gln Leu Thr Gln \*\*\* Phe  
 ---  
 TCT CGC CCT CAG ACC ACT GCC AAC GTC TCG TCG TCG GAC ATT GCA AAC AGT CTT  
 441 450 459 468 477 486  
 AGA GCG GGA GTC TGG TGA CCG TTG CAG AGC AGC ACC CTG TAA CGT TTG TCA GAA  
 ---  
 Arg Ala Gly Val Trp \*\*\* Pro Leu Gln Ser Ser Thr Leu \*\*\* Arg Leu Ser Glu  
 Glu Arg Glu Ser Gly Asp Arg Cys Arg Ala Ala Pro Cys Asn Val Cys Gln Lys  
 Ser Gly Ser Leu Val Thr Val Ala Glu Gln His Pro Val Thr Phe Val Arg Asn

Glu Ala Pro Gln Ser Phe Lys Gln Phe His Ala Pro Phe His Leu Leu Thr Ile  
 Lys Arg Pro Ser Ala Ser Ser Lys Phe Thr Leu Pro Phe Ile Cys Phe Arg Ser  
 Asn Gly Arg Ala Pro Gln Val Lys Ser Leu Ser Arg Ser Phe Ala Ser Ala His  
 ---  
 TAA AGG CGC CCG ACC GAC TTG AAA ACT TTC ACT CGC CCT TTT ACG TCT TCG CAC  
 495 504 513 522 531 540  
 ATT TCC GCG GCG TGG CTG AAC TTT TGA AAG TGA GCG GGA AAA TGC AGA AGC GTG  
 ---  
 Ile Ser Ala Gly Trp Leu Asn Phe \*\*\* Lys \*\*\* Ala Gly Lys Cys Arg Ser Val  
 Phe Pro Arg Ala Gly \*\*\* Thr Phe Glu Ser Glu Arg Glu Asn Ala Glu Ala \*\*\*  
 Phe Arg Gly Leu Ala Glu Leu Leu Lys Val Ser Gly Lys Met Gln Lys Arg Asp

FIGURE 8 (suite 1)

17/26

Pro Leu Ser Ile Tyr Val Asp Asn His Pro Trp Arg Pro Thr Thr Phe Ala Phe  
 Gln Phe Val Leu Thr Cys Thr Met Thr Pro Gly Gly Pro His Pro Leu Leu Leu  
 Asn Ser Ser \*\*\* His Val Arg \*\*\* Gln Pro Ala Val Gln Thr His Tyr Phe Cys  
 ---  
 TAA CCT TCT GAT TAC ATG TGC AGT AAC ACC CCG GTG GAC CCA CAC CAT TTT CGT  
 549 558 567 576 585 594  
 ATT GGA AGA CTA ATG TAC ACG TCA TTG TGG GGC CAC CTG GGT GTG GTA AAA GCA  
 ---  
 Ile Gly Arg Leu Met Tyr Thr Ser Leu Trp Gly His Leu Gly Val Val Lys Ala  
 Leu Glu Asp \*\*\* Cys Thr Arg His Cys Gly Ala Thr Trp Val Trp \*\*\* Lys Gln  
 Trp Lys Thr Asn Val His Val Ile Val Gly Pro Pro Gly Cys Gly Lys Ser Lys

Pro Ser Ser Ile Lys Cys Val Arg Phe Gly Cys Val Pro Phe Trp Arg Ser Val  
 His Ala Ala Leu Lys Ala Ser Gly Ser Val Val Tyr Gln Phe Gly Gly Leu Phe  
 Ile Pro Gln \*\*\* Asn Gln Leu Gly Pro Phe Trp Met Ser Ser Val Val \*\*\* Phe  
 ---  
 TTA CCC GAC GAT TAA AAC GTC TGG GCC TTT GGT GTA TGA CCT TTG GTG GAT CTT  
 603 612 621 630 639 648  
 AAT GGG CTG CTA ATT TTG CAG ACC CCG AAA CCA CAT ACT GGA AAC CAC CTA GAA  
 ---  
 Asn Gly Leu Leu Ile Leu Gln Thr Arg Lys Pro His Thr Gly Asn His Leu Glu  
 Met Gly Cys \*\*\* Phe Cys Arg Pro Gly Asn His Ile Leu Glu Thr Thr \*\*\* Lys  
 Trp Ala Ala Asn Phe Ala Asp Pro Glu Thr Thr Tyr Trp Lys Pro Pro Arg Asn

Leu Pro Pro Ile Thr Val Met Thr Phe Phe His Asn Asn Asn Ile Val Lys Ile  
 Leu His His Ser Pro \*\*\* Trp Pro Ser Ser Thr Thr Thr Ile Ser Ser Lys \*\*\*  
 Cys Thr Thr Pro His Asn Gly His His Leu Leu Pro Gln \*\*\* Gln His Ser Lys  
 ---  
 TGT TCA CCA CCC TAC CAA TGG TAC CAC TTC TTC ACC AAC AAT AAC TAC TGA AAA  
 657 666 675 684 693 702  
 ACA AGT GGT GGG ATG GTT ACC ATG GTG AAG AAG TGG TTG TTA TTG ATG ACT TTT  
 ---  
 Thr Ser Gly Gly Met Val Thr Met Val Lys Lys Trp Leu Leu Leu Met Thr Phe  
 Gln Val Val Gly Trp Leu Pro Trp \*\*\* Arg Ser Gly Cys Tyr \*\*\* \*\*\* Leu Leu  
 Lys Trp Trp Asp Gly Tyr His Gly Glu Glu Val Val Val Ile Asp Asp Phe Tyr

Ala Pro Gln Gly Pro Ile Ile \*\*\* Gln Ser Gln Thr Ile Ser Ile Trp Gln Ser  
 Pro Gln Ser Gly Gln Ser Ser Arg Ser Leu Ser His Ser Arg Tyr Gly Asn Val  
 His Ser Ala Ala Arg Pro His Asp Val Ser Val Thr His Asp Ile Asp Met Ser  
 ---  
 TAC CGA CCG ACG GGA CCC TAC TAG ATG ACT CTG ACA CAC TAG CTA TAG GTA ACT  
 711 720 729 738 747 756  
 ATG GCT GGC TGC CCT GGG ATG ATC TAC TGA GAC TGT GTG ATC GAT ATC CAT TGA  
 ---  
 Met Ala Gly Cys Pro Gly Met Ile Tyr \*\*\* Asp Cys Val Ile Asp Ile His \*\*\*  
 Trp Leu Ala Ala Leu Gly \*\*\* Ser Thr Glu Thr Val \*\*\* Ser Ile Ser Ile Asp  
 Gly Trp Leu Pro Trp Asp Asp Leu Leu Arg Leu Cys Asp Arg Tyr Pro Leu Thr

Tyr Leu Ser Phe Thr Ser Ser Tyr Arg Lys Gln Gly Ala Thr Asn Gln Asn Gly  
 Thr Ser Val Leu Pro Pro Val Thr Gly Lys Lys Ala Arg Leu Ile Arg Ile Val  
 Gln Leu Ser \*\*\* Leu His Phe Gln Val Lys Lys Pro Gly Cys Tyr Glu Ser \*\*\*  
 ---  
 GAC ATC TCT GAT TTC CAC CTT GAC ATG GAA AAA ACC GGG CGT CAT AAG ACT AAT  
 765 774 783 792 801 810  
 CTG TAG AGA CTA AAG GTG GAA CTG TAC CTT TTT TGG CCC GCA GTA TTC TGA TTA  
 ---  
 Leu \*\*\* Arg Leu Lys Val Glu Leu Tyr Leu Phe Trp Pro Ala Val Phe \*\*\* Leu  
 Cys Arg Asp \*\*\* Arg Trp Asn Cys Thr Phe Phe Gly Pro Gln Tyr Ser Asp Tyr  
 Val Glu Thr Lys Gly Gly Thr Val Pro Phe Leu Ala Arg Ser Ile Leu Ile Thr

FIGURE 8 (suite 2)

18/26

Ala Ile Leu Gly Arg Gln Phe Pro Val Gly \*\*\* Ser Ser Asp Trp Ser Tyr Phe  
 Leu Leu \*\*\* Val Gly Asn Ser His Tyr Glu Glu Val Ala Thr Gly Ala Thr Ser  
 Trp Cys Asp Ser Gly Thr Pro Ile Thr Ser Arg Leu Gln Gln Gly Leu Gln Leu  
 ---  
 GGT CGT TAG TCT GGG GCA ACC TTA CCA TGA GGA GTT GAC GAC AAG GTC GAC ATC  
 819 828 837 846 855 864  
 CCA GCA ATC AGA CCC CGT TGG AAT GGT ACT CCT CAA CTG CTG TCC CAG CTG TAG  
 ---  
 Pro Ala Ile Arg Pro Arg Trp Asn Gly Thr Pro Gln Leu Leu Ser Gln Leu \*\*\*  
 Gln Gln Ser Asp Pro Val Gly Met Val Leu Leu Asn Cys Cys Pro Ser Cys Arg  
 Ser Asn Gln Thr Pro Leu Glu Trp Tyr Ser Ser Thr Ala Val Pro Ala Val Glu

Ser Lys Ile Pro Pro Asn Ser Gly Gln Tyr Lys Pro Leu Ile Ser Cys Phe Leu  
 Ala Arg \*\*\* Arg Leu Ile Val Glu Lys Thr Asn Gln Phe Phe Ala Val Ser Cys  
 Leu Glu Lys Asp Ser Ser \*\*\* Lys Arg Pro Ile Lys Ser Ser His \*\*\* Leu Val  
 ---  
 TTC GAG AAA TAG CCT CCT AAT GAA GGA ACC ATA AAA CCT TCT TAC GAT GTC TTG  
 873 882 891 900 909 918  
 AAG CTC TTT ATC GGA GGA TTA CTT CCT TGG TAT TTT GGA AGA ATG CTA CAG AAC  
 ---  
 Lys Leu Phe Ile Gly Gly Leu Leu Pro Trp Tyr Phe Gly Arg Met Leu Gln Asn  
 Ser Ser Leu Ser Glu Asp Tyr Phe Leu Gly Ile Leu Glu Glu Cys Tyr Arg Thr  
 Ala Leu Tyr Arg Arg Ile Thr Ser Leu Val Phe Trp Lys Asn Ala Thr Glu Gln

Gly Arg Leu Phe Pro Ala Leu Glu Asp Gly Lys Gly Gly Trp Ala Arg Phe Lys  
 Asp Val Ser Ser Pro Pro Trp Asn Thr Val Arg Glu Gly Gly His Gly Ser Asn  
 Ile Trp Pro Pro Leu Pro Gly Thr Arg \*\*\* Gly Lys Gly Gly Met Gly Gln Ile  
 ---  
 TTA GGT GCC TCC TTC CCC CGG TCA AGC AGT GGG AAA GGG GGG GTA CCG GAC TTA  
 927 936 945 954 963 972  
 AAT CCA CGG AGG AAG GGG GCC AGT TCG TCA CCC TTT CCC CCC CAT GCC CTG AAT  
 ---  
 Asn Pro Arg Arg Lys Gly Ala Ser Ser Ser Pro Phe Pro Pro His Ala Leu Asn  
 Ile His Gly Gly Arg Gly Pro Val Arg His Pro Phe Pro Pro Met Pro \*\*\* Ile  
 Ser Thr Glu Glu Gly Gly Gln Phe Val Thr Leu Ser Pro Pro Cys Pro Glu Phe

Trp Ile Phe Tyr Ile Val Ser Asp Lys Lys Asp Ser Arg Leu Pro Lys \*\*\* \*\*\*  
 Gly Tyr Ser Ile Phe \*\*\* Gln Thr Lys Lys Ile Val Glu Tyr His Asn Lys Asn  
 Glu Met His Phe Leu Asn Ser Leu Arg Lys \*\*\* \*\*\* Lys Thr Ile Thr Lys Ile  
 ---  
 AAG GTA TAC TTT ATT TAA TGA CTC AGA AAA AAT AGT GAA GCA TTA CCA AAA ATA  
 981 990 999 1008 1017 1026  
 TTC CAT ATG AAA TAA ATT ACT GAG TCT TTT TTA TCA CTT CGT AAT GGT TTT TAT  
 ---  
 Phe His Met Lys \*\*\* Ile Thr Glu Ser Phe Leu Ser Leu Arg Asn Gly Phe Tyr  
 Ser Ile \*\*\* Asn Lys Leu Leu Ser Leu Phe Tyr His Phe Val Met Val Phe Ile  
 Pro Tyr Glu Ile Asn Tyr \*\*\* Val Phe Phe Ile Thr Ser \*\*\* Trp Phe Leu Leu

Glu Asn Leu Thr Leu His Pro Thr Lys Leu Ile Leu Asn Glu Ser Asn Tyr Met  
 Asn Met Leu Pro \*\*\* Thr Pro Pro Arg \*\*\* Phe \*\*\* Ile Arg Gln Ile Thr Cys  
 Ile \*\*\* \*\*\* Pro Asn Leu Pro Pro Asp Lys Phe Asn Phe Glu Arg Phe Gln Val  
 ---  
 ATA AGT AAT TCC CAA TTC ACC CCC CAG AAA TTT TAA TTT AAG AGA CTT AAC ATG  
 1035 1044 1053 1062 1071 1080  
 TAT TCA TTA AGG GTT AAG TGG GGG GTC TTT AAA ATT AAA TTC TCT GAA TTG TAC  
 ---  
 Tyr Ser Leu Arg Val Lys Trp Gly Val Phe Lys Ile Lys Phe Ser Glu Leu Tyr  
 Ile His \*\*\* Gly Leu Ser Gly Gly Ser Leu Lys Leu Asn Ser Leu Asn Cys Thr  
 Phe Ile Lys Gly \*\*\* Val Gly Gly Leu \*\*\* Asn \*\*\* Ile Leu \*\*\* Ile Val His

FIGURE 8 (suite 3)

19/26

Cys Pro \*\*\* Val Ser Ile Thr Asn Arg Thr Thr Tyr Val Thr Lys Ser Arg Leu  
 Val His Asn Cys Pro Tyr Gln Ile Gly Pro Arg Ile Tyr Gln Lys Arg Val Cys  
 Tyr Met Thr Val Arg Ile Asn Tyr Glu Gln Asp Tyr Ile Ser Asn Glu Phe Ala  
 ---  
 TAT GTA CCA ATG TGC CTA TAA CAT AAG GAC CAG CAT ATA TGA CAA AAG CTT GCG  
 1089 1098 1107 1116 1125 1134  
 ATA CAT GGT TAC ACG GAT ATT GTA TTC CTG GTC GTA TAT ACT GTT TTC GAA CGC  
 ---  
 Ile His Gly Tyr Thr Asp Ile Val Phe Leu Val Val Tyr Thr Val Phe Glu Arg  
 Tyr Met Val Thr Arg Ile Leu Tyr Ser Trp Ser Tyr Ile Leu Phe Ser Asn Ala  
 Thr Trp Leu His Gly Tyr Cys Ile Pro Gly Arg Ile Tyr Cys Phe Arg Thr Gln  
  
 Ala Ser Ala \*\*\* Thr Thr \*\*\* Met Glu Leu Leu Lys Tyr Asp \*\*\* Gly Cys Ser  
 His Arg Pro Arg Arg Pro Arg Cys Lys Trp Cys Asn Thr Thr Glu Ala Val Ala  
 Thr Gly Leu Gly Val His Asp Val Asn Gly Ala Thr Gln Leu Arg Leu Trp Leu  
 ---  
 TCA CGG CTC CGG ATG CAC CAG ATG TAA AGG TCG TCA AAC ATC AGA GTC GGT GTC  
 1143 1152 1161 1170 1179 1188  
 AGT GCC GAG GCC TAC GTG GTC TAC ATT TCC AGC AGT TTG TAG TCT CAG CCA CAG  
 ---  
 Ser Ala Glu Ala Tyr Val Val Tyr Ile Ser Ser Ser Leu \*\*\* Ser Gln Pro Gln  
 Val Pro Arg Pro Thr Trp Ser Thr Phe Pro Ala Val Cys Ser Leu Ser His Ser  
 Cys Arg Gly Leu Arg Gly Leu His Phe Gln Gln Phe Val Val Ser Ala Thr Ala  
  
 Thr Glu Lys Thr Thr Gln Asn Ser Thr Ile Leu Leu Ser Ile \*\*\* Ser Leu Asn  
 Pro Lys Lys Gln Gln Lys Thr Pro Leu Leu \*\*\* Tyr His Phe Arg Pro Cys Thr  
 Gln Asn Arg Lys Asn Asn Pro Gln Phe Tyr Asp Ile Thr Phe Asp Leu Val Pro  
 ---  
 GAC CAA AGA AAA CAA CAA ACC AAC CTT CAT TAG TTA TCA CTT TAG ATC CTG TCC  
 1197 1206 1215 1224 1233 1242  
 CTG GTT TCT TTT GTT GTT TGG TTG GAA GTA ATC AAT AGT GAA ATC TAG GAC AGG  
 ---  
 Leu Val Ser Phe Val Val Trp Leu Glu Val Ile Asn Ser Glu Ile \*\*\* Asp Arg  
 Trp Phe Leu Leu Leu Phe Gly Trp Lys \*\*\* Ser Ile Val Lys Ser Arg Thr Gly  
 Gly Phe Phe Cys Cys Leu Val Gly Ser Asn Gln \*\*\* \*\*\* Asn Leu Gly Gln Val  
  
 Pro Pro Leu Thr Gly Pro Thr Thr Pro Ser Pro Ser Pro \*\*\* Pro Ile Ala Pro  
 Gln Pro Tyr Leu Val Pro Leu Pro Leu Leu Leu Ala Pro Asn His Tyr Pro Pro  
 Lys Pro Thr Phe Tyr Arg Ser His Tyr Ser Phe Pro Gln Thr Ile Thr His Arg  
 ---  
 AAA CCC CCA TTT CAT GGC CCT CAC CAT CCT CTT CCC GAC CCA ATA CCA TAC CCC  
 1251 1260 1269 1278 1287 1296  
 TTT GGG GGT AAA GTA CCG GGA GTG GTA GGA GAA GGG CTG GGT TAT GGT ATG CGC  
 ---  
 Phe Gly Gly Lys Val Pro Gly Val Val Gly Glu Gly Leu Gly Tyr Gly Met Ala  
 Leu Gly Val Lys Tyr Arg Glu Trp \*\*\* Glu Lys Gly Trp Val Met Val Trp Arg  
 Trp Gly \*\*\* Ser Thr Gly Ser Gly Arg Arg Arg Ala Gly Leu Trp Tyr Gly Gly  
  
 Pro Thr Thr \*\*\* Met Pro Thr Met Pro Ser Pro Gln Pro Arg Gln \*\*\* Leu Thr  
 Leu Leu Lys Cys Leu Pro \*\*\* Leu His Pro Ser His Gly Lys Asn Cys Leu  
 Ser Ser Tyr Asn Val Tyr Pro Asp Tyr Thr Leu Ala Thr Ala Lys Thr Val Phe  
 ---  
 CCT CCT CAT CAA ATG TAT CCC CAG TAT CCA CTC CCG ACA CCG GAA ACA ATG TTT  
 1305 1314 1323 1332 1341 1350  
 GGA GGA GTA GTT TAC ATA GGG GTC ATA GGT GAG GGC TGT GGC CTT TGT TAC AAA  
 ---  
 Gly Gly Val Val Tyr Ile Gly Val Ile Gly Glu Gly Cys Gly Leu Cys Tyr Lys  
 Glu Glu \*\*\* Phe Thr \*\*\* Gly Ser \*\*\* Val Arg Ala Val Ala Phe Val Thr Lys  
 Arg Ser Ser Leu His Arg Gly His Arg \*\*\* Gly Leu Trp Pro Leu Leu Gln Ser

FIGURE 8 (suite 4)

20/26

Ile Met \*\*\* Phe Leu Leu Val Pro Ala Trp Glu Gly Thr Val Arg Pro Ser Arg  
 \*\*\* \*\*\* Arg Phe Tyr Cys Cys Gln Leu Gly Ser Gly Gln \*\*\* Gly Pro His Asp  
 Asn Asp Asp Leu Ile Val Ala Ser Ser Gly Val Gly Arg Asp Gly Gln Thr Ile  
 ---  
 CAA TAG TAG ATT TTA TTG TCG TGA CCT CGG GTG AGG GGA CAG TGG GAC CCA CTA  
 1359 1368 1377 1386 1395 1404  
 GTT ATC ATC TAA AAT AAC AGC ACT GGA GCC CAC TCC CCT GTC ACC CTG GGT GAT  
 ---  
 Val Ile Ile \*\*\* Asn Asn Ser Thr Gly Ala His Ser Pro Val Thr Leu Gly Asp  
 Leu Ser Ser Lys Ile Thr Ala Leu Glu Pro Thr Pro Leu Ser Pro Trp Val Ile  
 Tyr His Leu Lys \*\*\* Gln His Trp Ser Pro Leu Pro Cys His Pro Gly \*\*\* Ser

Pro Ala Pro Gly Ser Asn Leu Arg Leu Arg Glu \*\*\* Glu Thr Thr Asn Leu Pro  
 Pro Leu Leu Ala Leu Ile \*\*\* Gly \*\*\* Gly Lys Lys Asn Gln Leu Ile \*\*\* Leu  
 Pro Ser Cys Pro Trp Phe Glu Val Lys Val Lys Arg Ile Arg Tyr Tyr Glu Phe  
 ---  
 GCC CCT CGT CCC GGT CTT AAG TTG GAA TTG GAA AGA ATA AGA CAT CAT AAG TTT  
 1413 1422 1431 1440 1449 1458  
 CGG GGA GCA GGG CCA GAA TTC AAC CTT AAC CTT TCT TAT TCT GTA GTA TTC AAA  
 ---  
 Arg Gly Ala Gly Pro Glu Phe Asn Leu Asn Leu Ser Tyr Ser Val Val Phe Lys  
 Gly Glu Gln Gly Gln Asn Ser Thr Leu Thr Phe Leu Ile Leu \*\*\* Tyr Ser Lys  
 Gly Ser Arg Ala Arg Ile Gln Pro \*\*\* Pro Phe Leu Phe Cys Ser Ile Gln Arg

Cys Leu Ala Pro Thr Gln Gly Gly Glu Gln Pro Phe Phe Thr Met Leu Ile Ser  
 Ala Cys Leu Pro Pro Lys Val Gly Arg Arg Pro Ser Ser Leu \*\*\* Tyr Gln  
 Pro Val Ser Arg Pro Asn Ser Gly Gly Gly Pro Pro Leu Phe Asp Asn Ile Asn  
 ---  
 CCC GTG TCT CGC CCC CAA ACT GGG GGG AGG ACC CCC TTC TTT CAG TAA TTA TAA  
 1467 1476 1485 1494 1503 1512  
 GGG CAC AGA GCG GGG GTT TGA CCC CCC TCC TGG GGG AAG AAA GTC ATT AAT ATT  
 ---  
 Gly His Arg Ala Gly Val \*\*\* Pro Pro Ser Trp Gly Lys Lys Val Ile Asn Ile  
 Gly Thr Glu Arg Gly Phe Asp Pro Pro Pro Gly Gly Arg Lys Ser Leu Ile Leu  
 Ala Gln Ser Gly Gly Leu Thr Pro Leu Leu Gly Glu Glu Ser His \*\*\* Tyr \*\*\*

Asp \*\*\* \*\*\* Thr Trp Arg Gly Pro Pro Arg Glu Ser Gln Pro Glu Ser Ser Leu  
 Ile Glu Asp His Gly Gly Gly Leu Leu Ala Asn Gln Ser His Asn Ala Gln Cys  
 Phe Arg Met Met Asp Val Ala Trp Ser Pro Thr Arg Val Thr Thr Arg Lys Val  
 ---  
 CTT AGA GTA GTA CAG GTG GCG GGT CCT CCC GCA AGA CTG ACA CCA AGC GAA CTG  
 1521 1530 1539 1548 1557 1566  
 GAA TCT CAT CAT GTC CAC CGC CCA GGA GGG CGT TCT GAC TGT GGT TCG CTT GAC  
 ---  
 Glu Ser His His Val His Arg Pro Gly Gly Arg Ser Asp Cys Gly Ser Leu Asp  
 Asn Leu Ile Met Ser Thr Ala Gln Glu Gly Val Leu Thr Val Val Arg Leu Thr  
 Ile Ser Ser Cys Pro Pro Pro Arg Arg Ala Phe \*\*\* Leu Trp Phe Ala \*\*\* Gln

Ile Asp Ser Pro Ala Pro Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ala Met Lys Gly Glu Gly  
 Tyr Ile Arg Leu His Pro Leu Pro Pro His Gln Leu His Trp Lys Glu Lys Glu  
 Thr Tyr Gly Phe Thr Arg Ser Leu Arg Thr Asn Phe Ile Gly Asn Lys Arg Arg  
 ---  
 TCA TAT AGG CTT CCA CGC CCT CTC CGC CCA CAA CTT CTA CGG TAA AAA GGA AGA  
 1575 1584 1593 1602 1611 1620  
 AGT ATA TCC GAA GGT GCG GGA GAG GCG GGT GTT GAA GAT GCC ATT TTT CCT TCT  
 ---  
 Ser Ile Ser Glu Gly Ala Gly Glu Ala Gly Val Glu Asp Ala Ile Phe Pro Ser  
 Val Tyr Pro Lys Val Arg Glu Arg Arg Val Leu Lys Met Pro Phe Phe Leu Leu  
 Tyr Ile Arg Arg Cys Gly Arg Gly Gly Cys \*\*\* Arg Cys His Phe Ser Phe Ser

FIGURE 8 (suite 5)



21/26

Ala Thr Val Thr Ala Pro Thr Ser Ser Gly Pro Ala Ala Ala Ser Ser Arg Ala  
 Leu Pro Leu Pro Pro Pro Pro Pro Pro Arg Ala Leu Pro Pro Pro Pro Pro Asp Pro  
 Trp Arg Tyr Arg His Arg Pro His Val Leu Trp Pro Arg Arg Arg Leu Ile Gln  
 ---  
 GGT CGC CAT TGC CAC CGC CCC CAC CTG CTC GGT CCC CGC CGC CGC CTC CTA GAC  
 1629 1638 1647 1656 1665 1674  
 CCA GCG GTA ACG GTG GCG GGG GTG GAC GAG CCA GGG GCG GCG GCG GAG GAT CTG  
 ---  
 Pro Ala Val Thr Val Ala Gly Val Asp Glu Pro Gly Ala Ala Ala Glu Asp Leu  
 Gln Arg \*\*\* Arg Trp Arg Gly Trp Thr Ser Gln Gly Arg Arg Arg Ile Trp  
 Ser Gly Asn Gly Gly Gly Gly Gly Gly Arg Ala Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
  
 Leu Ile Ala Ala Pro Ala Thr Asp Glu Glu Glu Thr Val Gly Gly Gln Ile Arg  
 Trp Ser Pro Gln Pro Pro Pro Thr Lys Lys Lys Pro Leu Ala Glu Lys Ser Val  
 Gly Leu His Ser Arg Pro Arg His Arg Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Pro Tyr  
 ---  
 CGG TTC TAC CGA CGC CCC CGC CAC AGA AGA AGA AGC CAT TGC GGA GGA ACC TAT  
 1683 1692 1701 1710 1719 1728  
 GCC AAG ATG GCT GCG GGG GCG GTG TCT TCT TCT TCG GTA ACG CCT CCT TGG ATA  
 ---  
 Ala Lys Met Ala Ala Gly Ala Val Ser Ser Ser Ser Val Thr Pro Pro Trp Ile  
 Pro Arg Trp Leu Arg Gly Arg Cys Leu Leu Leu Arg \*\*\* Arg Leu Leu Gly Tyr  
 Gln Asp Gly Cys Gly Gly Gly Val Phe Phe Phe Gly Asn Ala Ser Leu Asp Thr  
  
 \*\*\* Ile Gln Phe Arg Phe Phe His Ala Thr Leu Ile  
 Asp Tyr Arg Phe Val Phe Ser Thr Arg Gln Leu Tyr  
 Thr Met Asp Ser Phe Ser Leu Leu Ala Ser Tyr Thr Asn  
 ---  
 GCA GTA TAG ACT TTT GCT TTC TTC ACG CGA CAT TCA TAA 5'  
 1737 1746 1755 1764  
 CGT CAT ATC TGA AAA CGA AAG AAG TGC GCT GTA AGT ATT 3'  
 ---  
 Arg His Ile \*\*\* Lys Arg Lys Lys Cys Ala Val Ser Ile  
 Val Ile Ser Glu Asn Glu Arg Ser Ala Leu \*\*\* Val  
 Ser Tyr Leu Lys Thr Lys Glu Val Arg Cys Lys Tyr

FIGURE 8 (suite 6)

22/26

GMQ en grammes

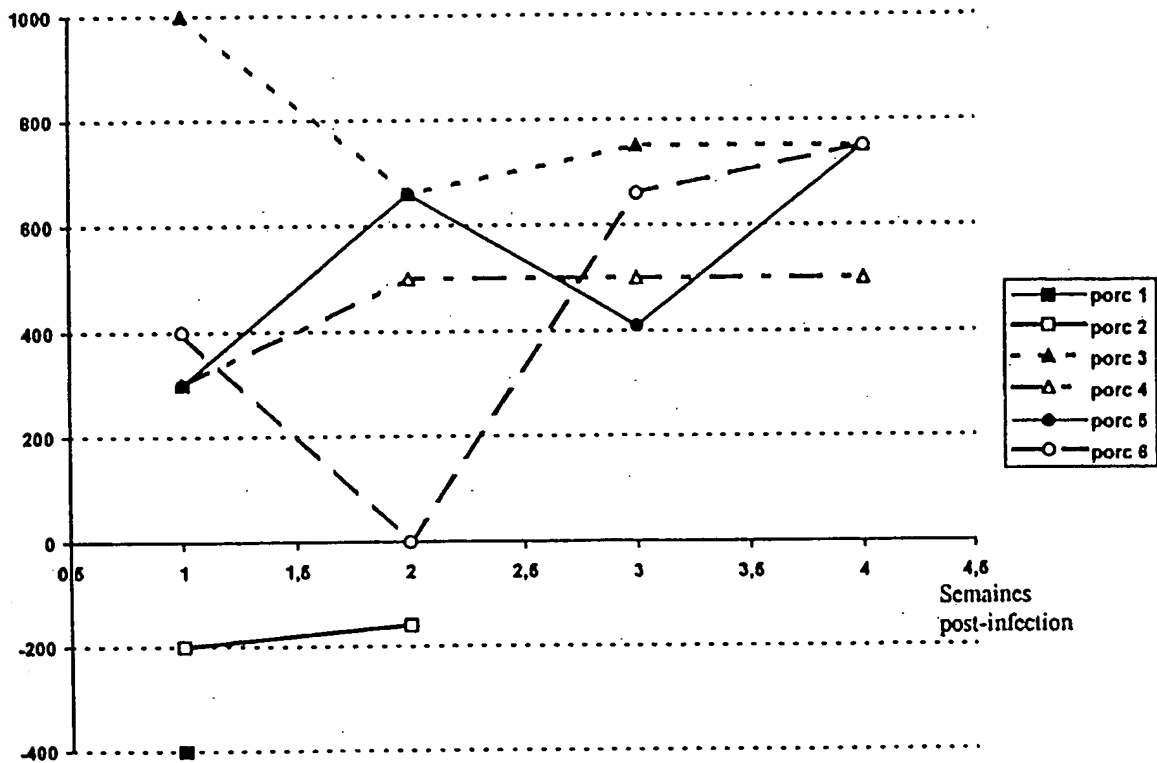


FIGURE 9

gmq : j0 - j28

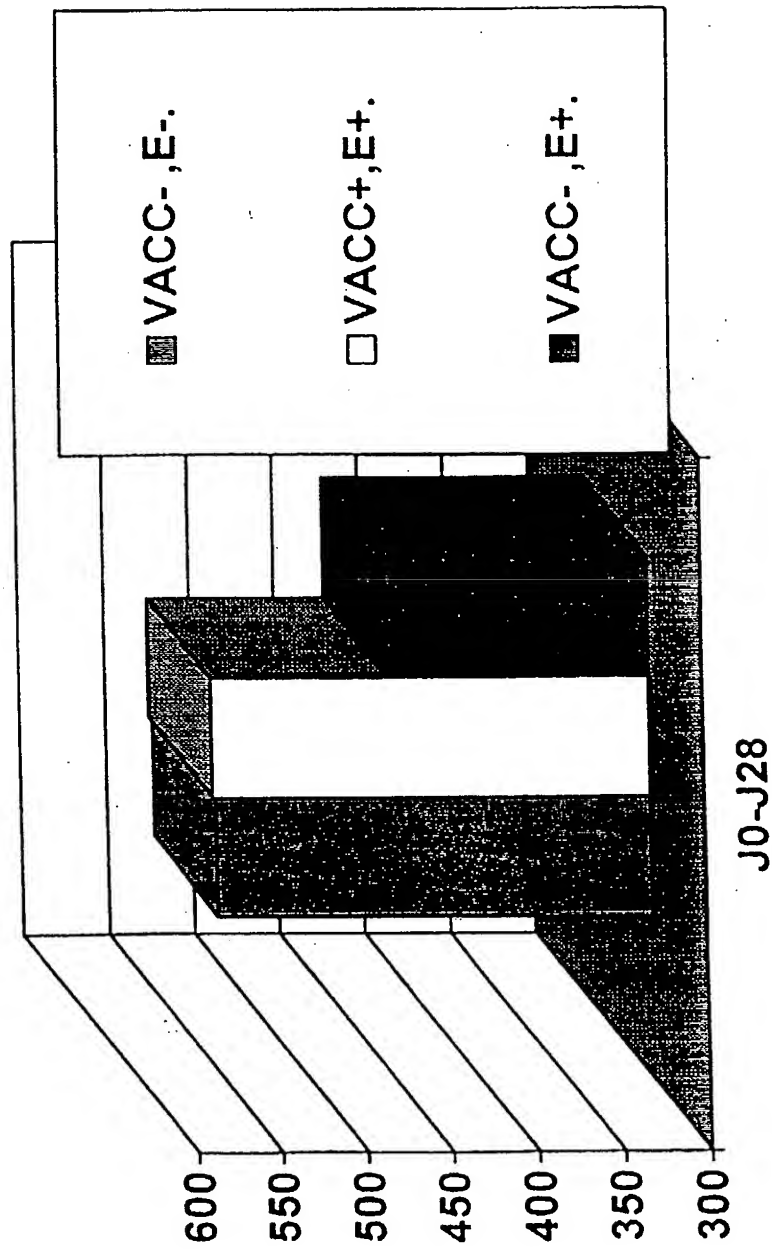


FIGURE 10

24/26

% HYPERTHERMIES > 41 °C

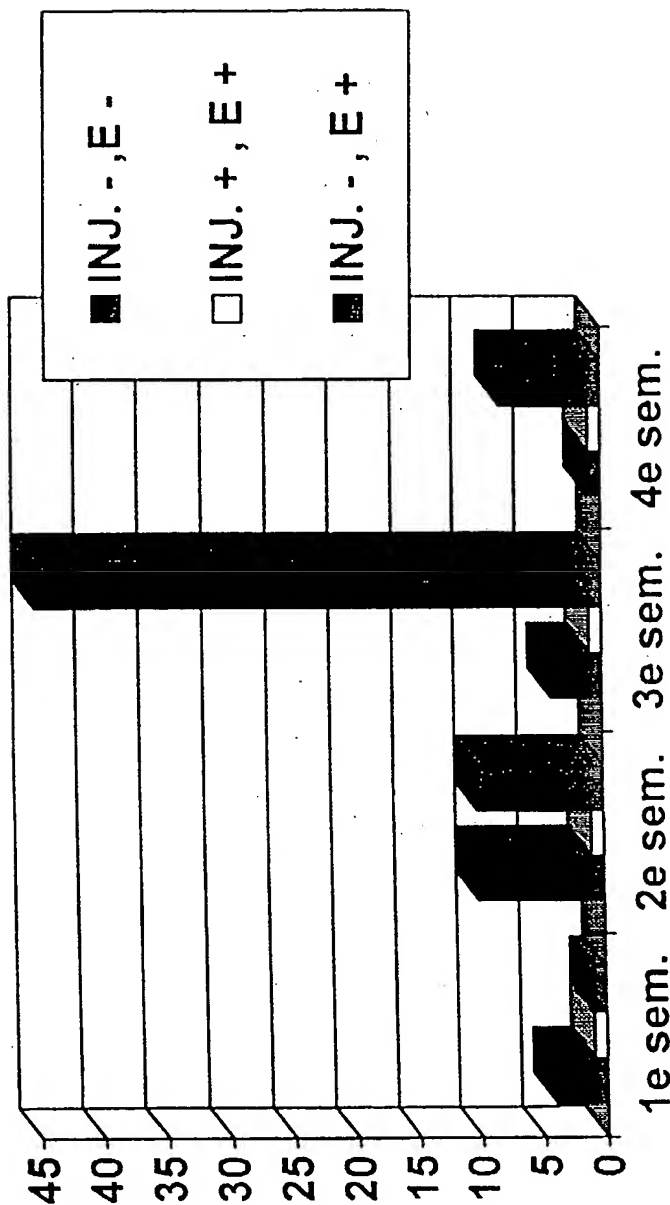
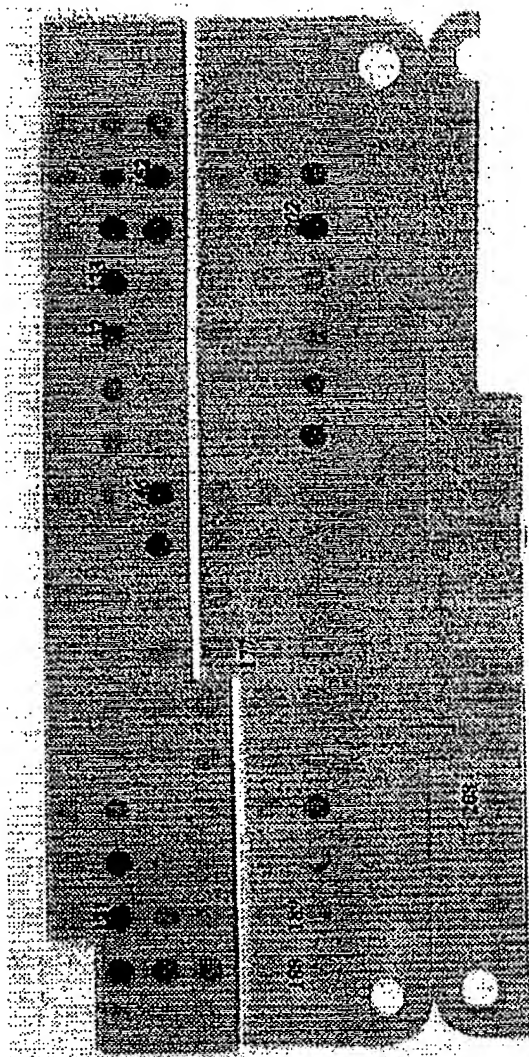


FIGURE 11



Type B  
spot n°104 à 159

Type A  
spot n°160 à 215

FIGURE 12

26/26

	50	51	
pcvA	MTWPRRRRRR	RRTRPRSHLG	NILRRRPYL
pcvB	MTYPRRRRRR	RRHRPRSHLG	QILRRRPWL
			HP..RHRYR
			RRKNGIENR
			LSRTEGYTVK
			RTTVRTPSWA
		100	101
			peptides 188 à 189
pcvA	VNELRENIQ	FLPPSGGTNP	LPLPEQYYRI
pcvB	VMMRENIND	FLPPGGGSP	RSVPFEYYRI
			RKVKVEFWPC
			SPITQGDGRV
			GSSAVILDDN
			FVTKATALTY
			peptides 132 à 133
			peptide 121
	150	151	
pcvA	DPYINYSSRH	TIRQPFTYHS	RYFTPKPELD
pcvB	DPYVNYSSRH	TITQPFESYHS	RYFTPKPVLD
			FTIDYEQPNN
			KRNQLWLRLQ
			TAGNVDPVGL
			GTFENSIYD
			peptide 208
			peptide 152
		235	
pcvA	QNYVVRLTIY	VQFREEFILKD	P.LNE
pcvB	QEYNIRVTMY	VQFREEFEKD	PPLNP

FIGURE 13

## LISTAGE DE SEQUENCE

<110> CENTRE NATIONAL D'ETUDES VETERINAIRES ET ALIMENTAIRES - CNEVA

<120> SEQUENCE GENOMIQUE ET POLYPEPTIDES DE CIRCOVIRUS  
ASSOCIE A LA MALADIE DE L'AMAIGRISSEMENT DU PORCELET  
(MAP), APPLICATIONS AU DIAGNOSTIC ET A LA PREVENTION  
ET/OU AU TRAITEMENT DE L'INFECTION

<130> D17221

<140>

<141>

<150> FR 97 15396

<151> 1997-12-05

<160> 20

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 1759

<212> ADN génomique

<213> Circovirus MAP type A

<220> Brin polarité + (5'-3')

<400> 1

```
accagcgcac ttcggcagcg gcagcacctc ggcagcgtca gtgaaaatgc caagcaagaa 60
aagcggcccg caaccata agaggtgggt gttcaccctt aataatcctt ccgaggagga 120
gaaaaaàaaa atacgggagc ttccaatctc cctttttgat tattttgttt gtggcgagga 180
aggtttggaa gagggtagaa ctctcacct ccaggggttt gcgaattttg ctaagaagca 240
gacttttaac aaggtgaagt ggtattttgg tgcccgtgc caccatcgaga aagcgaaagg 300
aaccgaccag cagaataaag aatactgcag taaagaaggc cacatactta tcgagtgtgg 360
agctccgcgg aaccagggga agcgcagcga cctgtctact gctgtgagta cctttttgga 420
gacggggtct ttggtgactg tagccgagca gtttctgtga acgtatgtga gaaatttccg 480
cgggctggct gaacttttga aagtgcgagg gaagatgcag aagcgtgatt ggaagacagc 540
tgtacacgtc atagtgggccc cgcccgggtg tgggaagagc cagtgggccc gtaattttgc 600
tgagcctagg gacacctact ggaagcctag tagaaataag tggtgaggat gatcatatgg 660
agaagaagtt gttgttttgg atgattttta tggctgggta ccttgggatg atctactgag 720
actgtgtgac cggtatccat tgactgtaga gactaaaggg ggtactgttc cttttttggc 780
ccgcagtatt ttgattacca gcaatcaggc cccccaggaa tggactcct caactgctgt 840
cccagctgta gaagctctct atcggaggat tactactttg caattttgga agactgctgg 900
agaacaatcc acggaggtac ccgaaggccg atttgaagca gtggaccac cctgtgccct 960
tttcccatat aaaataaatt actgagtcct ttttggtatc acatcgtaat ggtttttatt 1020
tttattcatt tagagggtct ttcaggataa attctctgaa ttgtacataa atagtcaacc 1080
ttaccacata attttgggct gtggttgcac tttggagcgc atagcccagg cctgtgtgct 1140
cgacattggt gtgggtattt aaatggagcc acagctggtt tcttttatta tttggctgga 1200
accaatcaat tggttggctc agctctgggt tgggggtgaa gtacctggag tggtaggtaa 1260
agggctgccc tatggtgtgg cgaggaggat agttaatata ggggtcatag gccaaagtgg 1320
tggagggggg tacaaagttg gcataccaaga taacaacagt ggaccaaca cctctttgat 1380
tagagggtgat ggggtctctg gggtaaaatt catatttagc ctttctaata cggtagtatt 1440
ggaaaggtag gggtaggggg ttggtgccgc ctgagggggg gaggaactgg ccgatgttga 1500
atctcagctc gttaacattc caagatggct gcgagtgtcc tcctcttatg gtgagtacaa 1560
attctctaga aaggcgggaa ttgaagatac ccgtctttcg gcgccatctg taacgggttc 1620
```

tgaaggcggg gtgtaccaa tatggtcttc tccggaggat gtttccaaga tggctgcggg 1680  
 ggcgggtccg tcttctgcgg taacgcctcc ttggccacgt catcctataa aagtgaaga 1740  
 agtgcgctgc tgtagtatt 1759

<210> 2

<211> 1759

<212> ADN génomique

<213> Circovirus MAP type A

<220> Brin polarité - (5'-3')

<400> 2

aatactacag cagcgcactt ctttcacttt tataggatga cgtggccaag gaggcgttac 60  
 cgcagaagac ggaccgcccc ccgcagccat cttggaaacg tcctccggag aagaccatat 120  
 ttggtacacc ccgccttcag aaaccgttac agatggcgcc gaaagacggg tatcttcaat 180  
 tcccgcttt ctagagaatt tgtactcacc ataagaggag gacactcgca gccatcttg 240  
 aatgttaacg agctgagatt caacatcggc cagttccctcc cccctcagg cggcaccaac 300  
 cccctacccc tacctttcca atactaccgt attagaaagg ctaaatatga attttcccc 360  
 agagacccca tcacctctaa tcaaagaggt gttgggtcca ctgtgttat cttggatgcc 420  
 aactttgtaa cccctccac caactggcc tatgaccct atattaacta ctcctccgc 480  
 cacaccataa ggcagccctt tacctaccac tccagggtact tcaccccaaa accagagcta 540  
 gaccaaaca ttgattggtt ccagccaaat aataaaagaa accagctgtg gctccattta 600  
 aatacccaca ccaatgtcga gcacacagge ctgggctatg cgctccaaa tgcaaccaca 660  
 gcccaaaatt atgtggttaag gttgactatt tatgtacaat tcagagaatt tatcctgaaa 720  
 gaccctctaa atgaataaaa ataaaaacca ttacgatgtg ataacaaaa agactcagta 780  
 atttatttta tatgggaaaa gggcacaggg tgggtccact gcttcaaata ggccttcggg 840  
 tacctccgtg gattgttctc cagcagttct ccaaaattgc aaagtagtaa tcctccgata 900  
 gagagcttct acagctggga cagcagttga ggagtacat tcctgggggg cctgattgct 960  
 ggtaatcaaa atactgcggg ccaaaaaagg aacagtacc ccttagtct ctacagtcaa 1020  
 tggataccgg tcacacagtc tcagtagatc atcccaagg aaccagccat aaaaatcatc 1080  
 caaaacaaca acttcttctc catgatatcc atcccaccac ttatttctac taggcttcca 1140  
 gtaggtgtcc ctaggctcag caaaattacg ggccacttg ctcttcccac aaccgggagg 1200  
 gccactatg acgtgtacag ctgtcttcca atcacgtgc tgcactctcc cgctcacttt 1260  
 caaaagtta gccagccgc ggaaatttct cacatacgtt acaggaaact gctcggctac 1320  
 agtcacaaa gcccctct ccaaaaagggt actcacagca gttagacagg cgctgcgctt 1380  
 cccctggttc cgcggagctc cacactcgat aagtatgtgg ccttctttac tgcagtattc 1440  
 tttattctgc tggctggttc ctttcgcttt ctcgatgtgg cagcgggcac caaaatacca 1500  
 cttcaccttg ttaaaagtct gcttcttagc aaaattcgca aaccctgga ggtgaggagt 1560  
 tctacccctt tccaaacctt cctcgccaca aacaaaataa tcaaaaagg agattggaag 1620  
 ctcccgattt ttgtttttct cctcctcgga aggtattata aggtgaaca cccacctctt 1680  
 atgggggtgc ggccgcttt tcttgcttgg cattttcact gacgctgccg aggtgctgcc 1740  
 gctgccgaag tgcgctggt 1759

<210> 3

<211> 939

<212> ADN

<213> Circovirus MAP type A

<220> ORF1

<400> 3

atgccaaagca agaaaagcgg cccgcaaccc cataagaggt ggggtgttcac ccttaataat 60  
 ccttccgagg aggagaaaa caaaatacgg gagcttccaa tctccctttt tgattatttt 120  
 gtttgtggcg aggaagggtt ggaagagggt agaactctc acctccagg gtttgccaat 180  
 ttgctaaga agcagacttt taacaagggt aagtgttatt ttggtgccg ctgccacatc 240  
 gagaaagcga aaggaaccga ccagcagaat aaagaatact gcagtaaaga aggccacata 300



```

cttatcgagt gtggagctcc gcggaaccag ggaagcgca gcgacctgtc tactgctgtg 360
agtacccttt tggagacggg gtctttggtg actgtagccg agcagtttcc tgtaacgtat 420
gtgagaaatt tccgcgggct ggctgaactt ttgaaagtga gcggaagat gcagcagcgt 480
gattggaaga cagctgtaca cgtcatagtg ggcgcgccg gttgtgggaa gagccagtgg 540
gcccgtaatt ttgctgagcc tagggacacc tactggaagc ctagttagaaa taagtgggtg 600
gatggatata atggagaaga agttgttgtt ttggatgatt tttatggctg gttaccttgg 660
gatgatctac tgagactgtg tgaccggtat ccattgactg tagagactaa aggggggtact 720
gttccctttt tggcccgag tattttgatt accagcnatc agggcccccga ggaatggtac 780
tcctcaactg ctgtcccagc tgtagaagct ctctatcgga ggattactac tttgcaattt 840
tggaagactg ctggagaaca atccacggag gtacccgaag gccgatttga agcagtggac 900
ccacctgtg cccttttccc atataaaata aattactga 939

```

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 702

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Circovirus MAP type A

&lt;220&gt; ORF2

&lt;400&gt; 4

```

atgacgtggc caaggaggcg ttaccgcaga agacggaccc gcccccgag ccattcttga 60
aacatcctcc ggagaagacc atatttggtg caccgcgct tcagaaaccg ttacagatgg 120
cgccgaaaga cgggtatctt caattcccgc ctttctagag aatttgtagt caccataaga 180
ggaggacact cgcagccatc ttggaatggt aacgagctga gattcaacat cggccagttc 240
ctccccccct caggcggcac caacccccta cccctacctt tccaatacta ccgtattaga 300
aaggctaaat atgaatttta cccagagac cccatcacct ctaatcaaag aggtgttggg 360
tccactgttg ttatcttggg tgccaacttt gtaacccct ccaccaactt ggcctatgac 420
ccctatatta actactctc ccgccacacc ataaggcagc cctttacctt ccactccagg 480
tacttcaccc ccaaaccaga gctagaccaa acaattgatt ggttccagcc aaataataaa 540
agaaaccagc tgtggctcca tttaaatacc cacaccaatg tcgagcacac aggcctgggc 600
tatgcgctcc aaaatgcaac cacagcccaa aattatgtgg taaggttgac tatttatgta 660
caattcagag aatttatcct gaaagacct ctaaatgaat aa 702

```

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 621

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Circovirus MAP type A

&lt;220&gt; ORF3

&lt;400&gt; 5

```

atgatatcca tcccaccact tatttctact aggttccag taggtgtccc taggtcagc 60
aaaattacgg gccactggc tcttcccaca accgggaggg cccactatga cgtgtacagc 120
tgtcttccaa tcacgtgct gcattctccc gctcactttc aaaagttcag ccagcccgcg 180
gaaatttctc acatacgtta caggaaactg ctcggtaca gtcaccaaag accccgtctc 240
caaaagggtg ctcacagcag tagacaggtc gctgcgcttc cctggttcc gcggagctcc 300
acactcgata agtatgtggc cttctttact gcagtattct ttattctgct ggtcggttcc 360
tttcgcttct tcgatgtggc agcgggcacc aaaataccac ttcacctgtt taaaagtctg 420
tttcttagca aaattcgcaa accctggag gtgaggagtt ctacctctt ccaaaccttc 480
ctcgccacaa acaaaataat caaaaaggga gattggaagc tcccgatttt tgtttttctc 540
ctcctcgga ggattattaa ggggtgaacac ccacctctta tggggttgcg ggccgctttt 600
cttgcttggc attttactg a 621

```

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 312

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Circovirus MAP type A

&lt;400&gt; 6

```

Met Pro Ser Lys Lys Ser Gly Pro Gln Pro His Lys Arg Trp Val Phe
 1          5          10          15
Thr Leu Asn Asn Pro Ser Glu Glu Glu Lys Asn Lys Ile Arg Glu Leu
          20          25          30
Pro Ile Ser Leu Phe Asp Tyr Phe Val Cys Gly Glu Glu Gly Leu Glu
          35          40          45
Glu Gly Arg Thr Pro His Leu Gln Gly Phe Ala Asn Phe Ala Lys Lys
          50          55          60
Gln Thr Phe Asn Lys Val Lys Trp Tyr Phe Gly Ala Arg Cys His Ile
          65          70          75          80
Glu Lys Ala Lys Gly Thr Asp Gln Gln Asn Lys Glu Tyr Cys Ser Lys
          85          90          95
Glu Gly His Ile Leu Ile Glu Cys Gly Ala Pro Arg Asn Gln Gly Lys
          100          105          110
Arg Ser Asp Leu Ser Thr Ala Val Ser Thr Leu Leu Glu Thr Gly Ser
          115          120          125
Leu Val Thr Val Ala Glu Gln Phe Pro Val Thr Tyr Val Arg Asn Phe
          130          135          140
Arg Gly Leu Ala Glu Leu Leu Lys Val Ser Gly Lys Met Gln Gln Arg
          145          150          155          160
Asp Trp Lys Thr Ala Val His Val Ile Val Gly Pro Pro Gly Cys Gly
          165          170          175
Lys Ser Gln Trp Ala Arg Asn Phe Ala Glu Pro Arg Asp Thr Tyr Trp
          180          185          190
Lys Pro Ser Arg Asn Lys Trp Trp Asp Gly Tyr His Gly Glu Glu Val
          195          200          205
Val Val Leu Asp Asp Phe Tyr Gly Trp Leu Pro Trp Asp Asp Leu Leu
          210          215          220
Arg Leu Cys Asp Arg Tyr Pro Leu Thr Val Glu Thr Lys Gly Gly Thr
          225          230          235          240
Val Pro Phe Leu Ala Arg Ser Ile Leu Ile Thr Ser Asn Gln Ala Pro
          245          250          255
Gln Glu Trp Tyr Ser Ser Thr Ala Val Pro Ala Val Glu Ala Leu Tyr
          260          265          270
Arg Arg Ile Thr Thr Leu Gln Phe Trp Lys Thr Ala Gly Glu Gln Ser
          275          280          285
Thr Glu Val Pro Glu Gly Arg Phe Glu Ala Val Asp Pro Pro Cys Ala
          290          295          300
Leu Phe Pro Tyr Lys Ile Asn Tyr
          305          310

```

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 233

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Circovirus MAP type A

&lt;400&gt; 7

```

Met Thr Trp Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg Thr Arg Pro Arg
 1          5          10          15
Ser His Leu Gly Asn Ile Leu Arg Arg Arg Pro Tyr Leu Val His Pro
          20          25          30
Ala Phe Arg Asn Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Thr Gly Ile Phe Asn
          35          40          45

```

5

Ser Arg Leu Ser Arg Glu Phe Val Leu Thr Ile Arg Gly Gly His Ser  
 50 55 60  
 Gln Pro Ser Trp Asn Val Asn Glu Leu Arg Phe Asn Ile Gly Gln Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Pro Pro Ser Gly Gly Thr Asn Pro Leu Pro Leu Pro Phe Gln Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Arg Ile Arg Lys Ala Lys Tyr Glu Phe Tyr Pro Arg Asp Pro Ile  
 100 105 110  
 Thr Ser Asn Gln Arg Gly Val Gly Ser Thr Val Val Ile Leu Asp Ala  
 115 120 125  
 Asn Phe Val Thr Pro Ser Thr Asn Leu Ala Tyr Asp Pro Tyr Ile Asn  
 130 135 140  
 Tyr Ser Ser Arg His Thr Ile Arg Gln Pro Phe Thr Tyr His Ser Arg  
 145 150 155 160  
 Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Glu Leu Asp Gln Thr Ile Asp Trp Phe Gln  
 165 170 175  
 Pro Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu His Leu Asn Thr His Thr  
 180 185 190  
 Asn Val Glu His Thr Gly Leu Gly Tyr Ala Leu Gln Asn Ala Thr Thr  
 195 200 205  
 Ala Gln Asn Tyr Val Val Arg Leu Thr Ile Tyr Val Gln Phe Arg Glu  
 210 215 220  
 Phe Ile Leu Lys Asp Pro Leu Asn Glu  
 225 230

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 206

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Circovirus MAP type A

&lt;400&gt; 8

Met Ile Ser Ile Pro Pro Leu Ile Ser Thr Arg Leu Pro Val Gly Val  
 1 5 10 15  
 Pro Arg Leu Ser Lys Ile Thr Gly Pro Leu Ala Leu Pro Thr Thr Gly  
 20 25 30  
 Arg Ala His Tyr Asp Val Tyr Ser Cys Leu Pro Ile Thr Leu Leu His  
 35 40 45  
 Leu Pro Ala His Phe Gln Lys Phe Ser Gln Pro Ala Glu Ile Ser His  
 50 55 60  
 Ile Arg Tyr Arg Lys Leu Leu Gly Tyr Ser His Gln Arg Pro Arg Leu  
 65 70 75 80  
 Gln Lys Gly Thr His Ser Ser Arg Gln Val Ala Ala Leu Pro Leu Val  
 85 90 95  
 Pro Arg Ser Ser Thr Leu Asp Lys Tyr Val Ala Phe Phe Thr Ala Val  
 100 105 110  
 Phe Phe Ile Leu Leu Val Gly Ser Phe Arg Phe Leu Asp Val Ala Ala  
 115 120 125  
 Gly Thr Lys Ile Pro Leu His Leu Val Lys Ser Leu Leu Ser Lys  
 130 135 140  
 Ile Arg Lys Pro Leu Glu Val Arg Ser Ser Thr Leu Phe Gln Thr Phe  
 145 150 155 160  
 Leu Ala Thr Asn Lys Ile Ile Lys Lys Gly Asp Trp Lys Leu Pro Tyr  
 165 170 175  
 Phe Val Phe Leu Leu Gly Arg Ile Ile Lys Gly Glu His Pro Pro  
 180 185 190

Leu Met Gly Leu Arg Ala Ala Phe Leu Ala Trp His Phe His  
 195 200 205

<210> 9

<211> 1767

<212> ADN génomique

<213> Circovirus MAP type B

<220> Brin polarité + (5'-3')

<400> 9

```
accagcgcac ttcggcagcg gcagcacctc ggcagcacct cagcagcaac atgcccagca 60
agaagaatgg aagaagcgga ccccaacccc ataaaagggtg ggtgttcaact ctgaataatc 120
cttccgaaga cgagcgcaag aaaatacggg atcttccaat atccctattt gattatttta 180
ttgttggcga ggagggtaat gaggaaggac gaacacctca cctccagggg ttcgctaatt 240
ttgtgaagaa gcagactttt aataaagtga agtgggtattt ggggtgccgc tgccacatcg 300
agaaagcgaa aggaacagat cagcagaata aagaatactg cagtaaagaa ggcaacttac 360
tgatggagtg tggagctcct agatctcagg gacaacggag tgacctgtct actgctgtga 420
gtaccttggt ggagagcggg agtctgggtga ccgttgacaga gcagcacctt gtaacgtttg 480
tcagaaattt ccgcgggctg gctgaacttt tgaaagtga cgggaaaatg cagaagcgtg 540
attggaagac taatgtacac gtcattgttg ggccacctgg gtgtggtaaa agcaaatggg 600
ctgctaattt tgcagacccg gaaaccacat actggaaacc acctagaaac aagtgggtgg 660
atggtttacca tgggtgaagaa gtggttggtta ttgatgactt ttatggctgg ctgccctggg 720
atgatctact gagactgtgt gatcgatata cattgactgt agagactaaa ggtggaactg 780
tacctttttt ggcccgcagt attctgatta ccagcaatca gaccccggtt gaatggtact 840
cctcaactgc tgtcccagct gtagaagctc tttatcggag gattacttcc ttggtatttt 900
ggaagaatgc tacagaacaa tccacggagg aagggggcca gttcgtcacc ctttcccccc 960
catgccctga atttccatat gaaataaatt actgagtcct ttttatcact tcgtaatggg 1020
ttttattatt catlaagggg taagtggggg gtcttttaaa ttaaattctc tgaattgtac 1080
atacatgggt acacggatat tgtattcctg gtcgtatata ctgttttcga acgcagtgcc 1140
gaggcctacg tgggtctacat ttccagcagt ttgtagtctc agccacagct ggtttctttt 1200
gttgtttggt tggaagtaat caatagtga atctaggaca ggtttggggg taaagtaccg 1260
ggagtggtag gagaagggct gggttatggt atggcgggag gagtagttta cataggggtc 1320
ataggtgagg gctgtggcct ttgttcaaaa gttatcatct aaaataacag cactggagcc 1380
cactccccct tcacctggg tgatcggggg gcaggggcag aattcaacct taacctttct 1440
tattctgtag tattcaaagg gcacagagcg ggggtttgac cccctcctg ggggaagaaa 1500
gtcattaata ttgaatctca tcatgtccac cgcccaggag ggcgttctga ctgtggttcg 1560
cttgacagta tatccgaagg tgcgggagag gcgggtgttg aagatgccat ttttccttct 1620
ccagcggtaa cggtggcggg ggtggacgag ccaggggcgg cggcggagga tctggccaag 1680
atggctgcgg gggcggtgtc ttcttcttcg gtaacgcctc cttggatacg tcatatctga 1740
aaacgaaaga agtgcgctgt aagtatt 1767
```

<210> 10

<211> 1767

<212> ADN génomique

<213> Circovirus MAP type B

<220> Brin polarité - (5'-3')

<400> 10

```
aatacttaca gcgcacttct ttcgttttca gatatgacgt atccaaggag gcgttaccga 60
agaagaagac accgcccccg cagccatctt ggccagatcc tccgccgccg cccctggctc 120
gtccaccccc gccaccgtta ccgctggaga aggaaaaatg gcattcttcaa caccgcctc 180
tcccgcacct tcggatatac tgtcaagcga accacagtca gaacgcctc ctggggcgtg 240
gacatgatga gattcaatat taatgacttt cttccccag gaggggggtc aaacccccgc 300
```

```

tctgtgccct ttgaatacta cagaataaga aagggttaagg ttgaattctg gccctgctcc 360
ccgatcacc cagggtgacag gggagtgggc tccagtgtctg ttatttttaga tgataacttt 420
gtaaacaaag ccacagccct cacctatgac ccctatgtaa actactcctc ccgccatacc 480
ataaccagc ccttctccta ccactcccgg tactttaccc ccaaacctgt cctagatttc 540
actattgatt acttccaacc aaacaacaaa agaaaccagc tgtggctgag actacnaact 600
gctggaaatg tagaccacgt aggcctcggc actgcttctg aaacagat atacgaccag 660
gaatacaata tccgtgtaac catgtatgta caattcagag aatttaattt taanagacccc 720
ccacttnacc cttaatgaat aataaaaacc attacgaagt gataaaaang actcagtaat 780
ttatttcata tggaaattca gggcatgggg gggaaagggt gacgaactgg ccccttctc 840
ccgtggattg ttctgtagca ttcttccaaa ataccaagga agtaatcctc cgataaagag 900
cttctacagc tgggacagca gttgaggagt accattccaa cggggtctga ttgctggtaa 960
tcagaatact gcgggccaaa aaaggtacag ttccaccttt agtctctaca gtcaatggat 1020
atcgatcaca cagtctcagt agatcatccc agggcagcca gccataaaaag tcatcaataa 1080
caaccacttc tcaccatgg taaccatccc accacttgtt tctaggtggt ttccagtatg 1140
tggtttccgg gtctgcaaaa ttagcagccc atttgccttt accacacca ggtggcccca 1200
caatgacgtg tacattagtc ttccaatcac gcttctgcat ttcccgctc actttcaaaa 1260
gttcagccag cccgcggaaa tttctgacaa acgttacagg gtgctgctct gcaacggtca 1320
ccagactccc gctctccaac aagggtactca cagcagtaga caggctactc cgttgtccct 1380
gagatctagg agctccacac tccatcagta agttgccttc tttactgcag tattctttat 1440
tctgctgata tgttcccttc gcttctctga tgtggcagcg ggcacccaaa taccacttca 1500
ctttattaaa agtctgcttc ttcaaaaaat tagcgaaccc ctggaggtag ggtgttcgtc 1560
cttctcatt accctcctcg ccaacaataa aataatcaaa tagggatatt ggaagatccc 1620
gtattttctt gcgctcgtct tcggaaggat tattcagagt gaacaccac cttttatggg 1680
gttgggggtc gcttcttcca ttcttcttgc tgggcatgtt gctgctgagg tgctgcccag 1740
gtgctgccgc tgccgaagtg cgctggt 1767

```

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 945

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Circovirus MAP type B

&lt;220&gt; ORF1

&lt;400&gt; 11

```

atgccagca agaagaatgg aagaagcgga ccccaacccc ataaaagggtg ggtgttcact 60
ctgaataatc cttccgaaga cgagcgcaag aaaatacggg atcttccaat atccctattt 120
gattatttta ttgttgcgga ggagggtaat gaggaaggac gaacacctca cctccagggg 180
ttcgctaatt ttgtgaagaa gcagactttt aataaagtga agtggatttt ggggtcccgc 240
tgccacatcg agaaagcgaa aggaacagat cagcagaata aagaatactg cagtaaagaa 300
ggcaacttac tgatggagtg tggagctcct agatctcagg gacaacggag tgacctgtct 360
actgctgtga gtaccttgtt ggagagcggg agtctggtga ccgttgaga gcagaccct 420
gtaacgtttg tcagaaattt ccgcgggctg gctgaacttt tgaaagttag cgggaaaatg 480
cagaagcgtg attggaagac taatgtacac gtcattgttg ggccacctgg gtgtggtaaa 540
agcaaatggg ctgctaattt tgcaacccg gaaaccacat actggaaacc acctagaaac 600
aagtgggtgg atggttacca tgggtgaagaa gtggttggtt ttgatgactt ttatggctgg 660
ctgccctggg atgatctact gagactgtgt gatcgatata cattgactgt agagactaaa 720
ggtggaactg tacctttttt ggcccgagc attctgatta ccagcaatca gaccccggtg 780
gaatgggtact cctcaactgc tgtcccagct gtagaagctc tttatcggag gattacttcc 840
ttggtatttt ggaagaatgc tacagaacaa tccacggagg aagggggcca gttcgtcacc 900
ctttccccc catgcctga atttccatat gaaataaatt actga 945

```

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 702

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Circovirus MAP type B

&lt;220&gt; ORF2

&lt;400&gt; 12

```

atgacgtatc caaggaggcg ttaccgaaga agaagacacc gccccgcag ccattcttggc 60
cagatcctcc gccgcgcgcc ctggctcgtc caccgccgcc accgttaccg ctggagaagg 120
aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccttcg gatatactgt caagcgaacc 180
acagtcagaa cgccctcctg ggcggtggac atgatgagat tcaatattaa tgactttctt 240
ccccaggag gggggtcaaa ccccgctct gtgccctttg aatactacag aataagaaag 300
gttaagggtg aattctggcc ctgctccccg atcaeccagg gtgacagggg agtgggctcc 360
agtgtgttta ttttagatga taactttgta acaanggcca cagccctcac ctatgacccc 420
tatgtaaact actcctcccg ccataccata acccagccct tctctacca ctcgcggtac 480
tttcccccca aacctgtcct agatttcact attgattact tccaaccaa caacaaaaga 540
aaccagctgt ggctgagact acaaactgct ggaaatgtag accacgtagg cctcggcact 600
gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggaa tacaatatcc gtgtaaccat gtatgtacaa 660
ttcagagaat ttaattttta agacccccca cttaaccctt aa 702

```

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 315

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Circovirus MAP type B

&lt;220&gt; ORF3

&lt;400&gt; 13

```

atggtaacca tcccaccact tgtttctagg tggtttccag tatgtggtt ccgggtctgc 60
aaaattagca gccatttgc ttttaccaca ccaggtggc ccacaatga cgtgtacatt 120
agtcttccaa tcacgcttct gcattttccc gctcactttc aaaagttcag ccagcccgcg 180
gaaatttctg acaaacgtta cagggtgctg ctctgcaacg gtcaccagac tcccgtctc 240
caacaaggta ctcacagcag tagacaggtc actccgttgt ccctgagatc taggagctcc 300
acactccatc agtaa 315

```

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 314

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Circovirus MAP type B

&lt;400&gt; 14

```

Met Pro Ser Lys Lys Asn Gly Arg Ser Gly Pro Gln Pro His Lys Arg
  1           5           10           15
Trp Val Phe Thr Leu Asn Asn Pro Ser Glu Asp Glu Arg Lys Lys Ile
          20           25           30
Arg Asp Leu Pro Ile Ser Leu Phe Asp Tyr Phe Ile Val Gly Glu Glu
          35           40           45
Gly Asn Glu Glu Gly Arg Thr Pro His Leu Gln Gly Phe Ala Asn Phe
          50           55           60
Val Lys Lys Gln Thr Phe Asn Lys Val Lys Trp Tyr Leu Gly Ala Arg
          65           70           75           80
Cys His Ile Glu Lys Ala Lys Gly Thr Asp Gln Gln Asn Lys Glu Tyr
          85           90           95
Cys Ser Lys Glu Gly Asn Leu Leu Met Glu Cys Gly Ala Pro Arg Ser
          100          105          110
Gln Gly Gln Arg Ser Asp Leu Ser Thr Ala Val Ser Thr Leu Leu Glu
          115          120          125
Ser Gly Ser Leu Val Thr Val Ala Glu Gln His Pro Val Thr Phe Val
          130          135          140
Arg Asn Phe Arg Gly Leu Ala Glu Leu Leu Lys Val Ser Gly Lys Met
          145          150          155          160
Gln Lys Arg Asp Trp Lys Thr Asn Val His Val Ile Val Gly Pro Pro

```

165 170 175  
 Gly Cys Gly Lys Ser Lys Trp Ala Ala Asn Phe Ala Asp Pro Glu Thr  
 180 185 190  
 Thr Tyr Trp Lys Pro Pro Arg Asn Lys Trp Trp Asp Gly Tyr His Gly  
 195 200 205  
 Glu Glu Val Val Val Ile Asp Asp Phe Tyr Gly Trp Leu Pro Trp Asp  
 210 215 220  
 Asp Leu Leu Arg Leu Cys Asp Arg Tyr Pro Leu Thr Val Glu Thr Lys  
 225 230 235 240  
 Gly Gly Thr Val Pro Phe Leu Ala Arg Ser Ile Leu Ile Thr Ser Asn  
 245 250 255  
 Gln Thr Pro Leu Glu Trp Tyr Ser Ser Thr Ala Val Pro Ala Val Glu  
 260 265 270  
 Ala Leu Tyr Arg Arg Ile Thr Ser Leu Val Phe Trp Lys Asn Ala Thr  
 275 280 285  
 Glu Gln Ser Thr Glu Glu Gly Gly Gln Phe Val Thr Leu Ser Pro Pro  
 290 295 300  
 Cys Pro Glu Phe Pro Tyr Glu Ile Asn Tyr  
 305 310

<210> 15  
 <211> 233  
 <212> PRT  
 <213> Circovirus MAP type B

<400> 15  
 Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg  
 1 5 10 15  
 Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro  
 20 25 30  
 Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg  
 35 40 45  
 Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Arg Thr Thr Val Arg Thr  
 50 55 60  
 Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu  
 65 70 75 80  
 Pro Pro Gly Gly Gly Ser Asn Pro Arg Ser Val Pro Phe Glu Tyr Tyr  
 85 90 95  
 Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr  
 100 105 110  
 Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn  
 115 120 125  
 Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr  
 130 135 140  
 Ser Ser Arg His Thr Ile Thr Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr  
 145 150 155 160  
 Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Phe Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro  
 165 170 175  
 Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ala Gly Asn  
 180 185 190  
 Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr Asp  
 195 200 205  
 Gln Glu Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe  
 210 215 220  
 Asn Phe Lys Asp Pro Pro Leu Asn Pro  
 225 230

10

```

<400> 16
Met Val Thr Ile Pro Pro Leu Val Ser Arg Trp Phe Pro Val Cys Gly
  1                    5                    10                    15
Phe Arg Val Cys Lys Ile Ser Ser Pro Phe Ala Phe Thr Thr Pro Arg
          20                    25                    30
Trp Pro His Asn Asp Val Tyr Ile Ser Leu Pro Ile Thr Leu Leu His
          35                    40                    45
Phe Pro Ala His Phe Gln Lys Phe Ser Gln Pro Ala Glu Ile Ser Asp
          50                    55                    60
Lys Arg Tyr Arg Val Leu Leu Cys Asn Gly His Gln Thr Pro Ala Leu
          65                    70                    75                    80
Gln Gln Gly Thr His Ser Ser Arg Gln Val Thr Pro Leu Ser Leu Arg
          85                    90                    95
Ser Arg Ser Ser Thr Leu His Gln
          100

```

<400> 17  
Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asn Asp Phe Leu Pro Pro Gly  
1 5 10 15

<400> 18  
Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp  
1 5 10 15

<400> 19  
Gly Val Gly Ser Ser Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn Phe Val Thr  
1 5 10 15

```
<210> 20
<211> 15
<212> PRT
<213> Circovirus MAP type B
<400> 20
Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr
  1           5           10          15
```